



# ALK1- JA BCL2- TRANSLOKAATIOKOETTIEMIEN TOIMIVUUS DIAGNOSTISISSA NÄYTTEISSÄ

Kromogeeninen in situ hybridisaatio -menetelmän  
testaus formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille

Opinnäytetyö

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala			
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Työn tekijä(t) Valtteri Juntunen, Evamaria Kokko			
Työn nimi ALK1- ja BCL2-translokaatiokoettimien toimivuus diagnostisissa näytteissä Kromogeeninen in situ hybridisaatio -menetelmän testaus formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille			
Päiväys	29.10.2013	Sivumäärä/Liitteet	66/24
Ohjaaja(t) Lehtori Jaana Hoffrén			
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Kuopion yliopistollinen sairaala, kuvantamiskeskus, kliinisen patologian yksikkö			
<p>Tiivistelmä</p> <p>Viime aikoina on tunnistettu enenevissä määrin geenimuutoksia syöpätautien taustalla. Syöpädiagnostiikassa on kehitetty molekyylibiologisia ja geneettisiä tutkimusmenetelmiä, joilla voidaan todentaa näitä geenimuutoksia ja mahdollistaa entistä tehokkaampi syöpien täsmähoito.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin Kuopion yliopistollisen sairaalan kuvantamiskeskuksen kliinisen patologian yksikössä keväällä 2013. Opinnäytetyön tarkoituksena oli suorittaa kromogeeninen in situ hybridisaatio (KISH) -menetelmän alustava sisäänajo (optimointi) ja tutkia translokaatiokoettimien ALK1 ja BCL2 toimivuutta formaliinifiksoiduilla parafiinileikkeillä. Opinnäytetyön tavoitteena oli arvioida KISH-menetelmän hyödynnettävyys KYSin patologian syöpädiagnostiikassa selvittämällä kuinka translokaatiokoettimet saadaan toimimaan käytetyllä näytemateriaalilla ja arvioimalla KISH-menetelmän vastaavuus rutiinikäytössä oleviin immunohistokemiallisiin (IHK) menetelmiin. ALK1-koettimen toimivuutta tutkittiin neuroblastooman, ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman ja anaplastisen suurisolulymfooman näytteillä. BCL2-koettimen toimivuutta tutkittiin follikulaarisen lymfooman näytteillä. Kaikki näytteet värjättiin IHK-menetelmillä, joiden perusteella valittiin näytteet KISH-menetelmän optimointiin. Menetelmiä verrattiin kymmenellä tutkimusnäytteellä, joista viisi oli BCL2-proteiinia ilmentäviä ja viisi ALK-proteiinia ilmentäviä. Työssä saavutetuilla tuloksilla selvitettiin KISH-menetelmän hyödynnettävyyttä IHK-menetelmän vaihtoehtomenetelmänä.</p> <p>KISH saatiin toimimaan tutkimuksessa käytetyillä translokaatiokoettimilla. Menetelmä toimi laite- ja reagenssivalmistajan (Dako) esivalidoitujen työohjeiden mukaisesti. Menetelmien todettiin vastaavan follikulaarisen lymfooman ja anaplastisen suurisolulymfooman näytteillä. Neuroblastoomanäytteillä menetelmät eivät vastanneet toisiaan. Ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman näytteillä ei saavutettu riittävän luotettavia tuloksia menetelmien vertaamiseksi. Opinnäytetyön perusteella KISH ei ole vaihtoehtomenetelmä IHK-värjäyksille näiden syöpätyyppien diagnostiikassa.</p>			
Avainsanat patologia, immunohistokemia, In Situ -hybridisaatio, translokaatio			

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Valtteri Juntunen, Evamaria Kokko			
Title of Thesis Applicability of translocation probes ALK1 and BCL2 in diagnostic pathology Testing of chromogenic in situ hybridization on formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimen			
Date	29.10.2013	Pages/Appendices	66/24
Supervisor(s) Senior Lecturer Jaana Hoffrén			
Client Organisation /Partners Kuopio University Hospital, Imaging Center, Department of Clinical Pathology			
<p>Abstract</p> <p>The amount of recognized genetic aberrations behind malignant tumours is constantly increasing. Research methods based on molecular biology and genetic information have been developed to identify these aberrations and work as a basis to provide more precise treatment.</p> <p>The study was conducted at the Kuopio University Hospital, Imaging center, Department of clinical pathology during spring 2013. The purpose of the study was to validate chromogenic in situ hybridization (CISH) -protocol and to examine the applicability of ALK1- and BCL2 -translocation probes on formalin-fixated and paraffin-embedded tissue specimen. The aim was to evaluate the applicability of CISH-protocol in cancer diagnostics at the department of clinical pathology. This was achieved by comparing the results of CISH-protocol to immunohistochemical (IHC) stainings, which are in diagnostic use. ALK1-probe was tested on neuroblastoma, non-small cell lung carcinoma and anaplastic large cell lymphoma specimen and BCL2 -probe on follicular lymphoma specimen. All specimens were first stained with IHC-protocols and those giving positive results were later stained with CISH. The protocols were compared with ten different samples, five of which were BCL2-positive and five respectively ALK-positive. It was also examined, if CISH-protocol would be an useful alternative to IHC-staining in diagnosis of studied cancer types.</p> <p>CISH proved to work with aforementioned translocation probes according to pre-validated protocol instructions provided by manufacturer (Dako). IHC and CISH protocols corresponded on follicular and anaplastic large cell lymphoma, on neuroblastoma they were contrary. Non-small cell lung carcinoma yielded results which can't be interpreted as reliable enough to make conclusions of the correspondence of IHC and CISH. According to this study CISH can't be held as an alternative for IHC staining in diagnostics of examined cancer types.</p>			
<p>Keywords pathology, Immunohistochemistry, In Situ Hybridization, Translocation</p>			

## SISÄLTÖ

1	JOHDANTO .....	7
2	SYÖVÄN SYNTY ELI KARSINOGENEESI.....	9
2.1	Syövän syntyprosessi .....	9
2.2	DNA- ja kromosomimuutokset syövän synnyssä .....	11
3	SYÖPÄDIAGNOSTISET MENETELMÄT .....	13
3.1	Histologisen näytteen kudosprosessointi .....	13
3.2	Immunohistokemia .....	14
3.3	Kromogeeninen in situ hybridisaatio .....	18
3.3.1	Translokaatiokoettimet .....	21
4	ANAPLASTINEN LYMFOOMAKINAASI.....	23
4.1	Neuroblastooma .....	24
4.2	Ei-pienisolainen keuhkokarsinoma .....	25
4.3	Anaplastinen suurisolulymfooma .....	25
5	B-SOLU LYMFOOMA 2.....	27
5.1	Follikulaarinen lymfooma .....	27
6	TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITTEET .....	29
7	TUTKIMUKSEN KULKU .....	30
7.1	Tutkimusmenetelmät .....	30
7.2	Tiedonhaku .....	31
7.3	Aiemmat tutkimukset .....	31
7.4	Näyttemateriaali.....	33
7.5	Laitteet ja reagenssit.....	34
7.6	Laboratoriotyövaiheen valmistelu .....	36
7.7	Immunohistokemialliset värjäykset.....	37
7.8	Kromogeenisen in situ hybridisaation optimointi.....	38
7.9	Näytteitten analysointi.....	40
8	TUTKIMUSTULOKSET .....	42
8.1	Translokaatiokoettimien toimivuus .....	42
8.2	IHK- ja KISH-menetelmien vastaavuus .....	43
8.3	KISH-menetelmän hyödynnettävyys .....	45

9	POHDINTA.....	46
9.1	Optimointiprosessin arviointi.....	46
9.2	Tulosten arviointi .....	50
9.3	Tulosten luotettavuus.....	53
9.4	Tulosten merkitys .....	56
9.5	Tutkimuksen eettisyys.....	56
9.6	Ammatillinen kasvu .....	57
	LÄHTEET .....	59
	LIITE 1: NOVOCASTRA ALK-VASTA-AINE.....	67
	LIITE 2: VENTANA BCL2-VASTA-AINE .....	70
	LIITE 3: DAKO AUTOSTAINER IHK-PROTOKOLLA 1 .....	73
	LIITE 4: DAKO AUTOSTAINER IHK-PROTOKOLLA 2.....	74
	LIITE 5: ENVISION FLEX +.....	75
	LIITE 6: VENTANA IHK-VÄRJÄYSPROTOKOLLA .....	76
	LIITE 7: ALK-KOETIN.....	78
	LIITE 8: BCL2-KOETIN .....	79
	LIITE 9: DAKO AUTOSTAINER KISH-PROTOKOLLA.....	80
	LIITE 10: STEP-BY-STEP FISH PROCEDURE FOR HISTOLOGY SAMPLES.....	81
	LIITE 11: KISH KOETINKOHTAISET PROTOKOLLAT.....	83
	LIITE 12: KUVALUETTELO .....	87
	LIITE 13: TUTKIMUSLUPA .....	88

Opinnäytetyössä käytettyjä termejä ja määritelmiä:

AFFINITEETTI	Kuvaa molekyylien välisen sitoutumisen voimakkuutta
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma, anaplastinen suurisolulymfooma
ALK	Anaplastinen lymfoomakinaasi, ALK-geenillä on tärkeä rooli solujen biologisten toimintojen säätelyssä
ANTIGEENI	Solujen toiminnan merkkiaineita, esimerkiksi proteiineja, joihin vasta-aineet sitoutuvat
APOPTOOSI	Ohjelmoitu solukuolema, yksittäisten solujen eliminaation mekanismi
BCL2	B-solu lymfooma 2 -proteiini on yksi ohjattua solukuolemaa säätelevistä tekijöistä
EKSPRESSIO	Geenin ilmentyminen
ENTSYYMI	Elimistön kemiallisten reaktioiden katalyytteja, entsyymireaktioissa on yleensä mukana SUBSTRAATTI, jonka entsyymi tarvitsee toimiakseen tietyllä tavalla
EPITOOPPI	Antigeenin epitoopiksi kutsuttu rakenneosa tarttuu vasta-aineen paratooppiin
FISH	Fluoresenssi in situ hybridisaatio, Fluorescence in situ hybridisation
FL	Follicular lymphoma, follikulaarinen lymfooma
FLUOROKROMI	Aine, joka absorboi lyhytaallonpituista valoa (kuten UV) ja säteilee ympäristöön pidempiaallonpituista valoa
IHK	Immunohistokemia, immunohistochemistry (IHC)
INHIBIITTORI	Toimii reaktiota hidastavana tai estävänä tekijänä
KISH	Kromogeeninen in situ hybridisaatio, Chromogenic in situ hybridisation (CISH)
KROMOGEENIT	Ryhmä kemiallisia molekyyliä, jotka voivat muodostaa värillisen lopputuotteen tiettyjen reaktiotuotteiden kanssa
NBL	Neuroblastoma, neuroblastooma
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma, ei-pienisoluinen keuhkokarsinoma
ONKOGEENI	Syöpägeeni, pohjimmiltaan normaalia solun toimintaa sääteleviä geenejä, joiden toiminnan aktivoituminen tai toiminnan häviäminen vaikuttavat syövän syntyyn
PARATOOPPI	Vasta-aineen tietty rakenneosa eli paratooppi tarttuu antigeenin epitoopiksi kutsuttuun rakenneosaan
PROTO-ONKOGEENI	Esisyöpägeeni, syöpägeeni, joka on elimistössä lepotilassa
VASTA-AINE	Aine, joka tunnistaa sille spesifisen antigeenin ja jonka paratooppi sitoutuu spesifiseen sitoutumiskohtaansa eli epitooppiin tietyllä affiniteetillä eli molekyylien välisellä vetovoimalla

## 1 JOHDANTO

Syöpätautien määrä on maailmanlaajuisesti kasvussa. WHO:n kansainvälinen syöväntutkimuskeskus (International Agency for Research on Cancer) arvioi, että maailmassa todettiin 12,7 miljoonaa uutta syöpätapausta vuonna 2008. Samana vuonna syöpään kuoli 7,6 miljoonaa ihmistä, mikä tarkoittaa noin 21 000 ihmistä päivässä. Vuoteen 2030 mennessä vuotuisten uusien syöpätapausten määrän odotetaan kasvavan 21,4 miljoonaan ja vuosittain syöpään kuolevien määrän 13,2 miljoonaan. (American Cancer Society 2011.) Vaikka syöpähoidot ovat edistyneet, kemoterapialla ja sädehoidolla on rajallinen vaikutus kuolevuuteen, mikä lisää uusien syövän toimintamekanismeihin perustuvien hoitomuotojen kysyntää. Syöpägeenien ja esisyöpägeenien löytyminen ovat olleet potentiaalisia kohteita uusien spesifisten lääkkeitten kehittymiselle. (Macdonald, Ford & Casson 2004, 203.) Syöpägeenejä ja geenimuutoksia vastaan kehitetyt hoidot vaativat entistä tarkempaa syöpädiagnostiikkaa. Tämä lisää sytogeneettisten ja molekyylibiologisten tutkimusten merkitystä syöpädiagnostiikassa (Franssila 2007, 91, 94).

Tässä opinnäytetyössä käytetyistä syöpädiagnostisista menetelmistä toinen on immunohistokemia (IHK), jolla voidaan tutkia syöpäsoluista muuntunutta proteiinin tuottoa. Sillä tutkitaan kudoksen toiminnasta kertovia merkkiaineita (antigeenejä), kuten proteiineja, vasta-aineiden avulla. IHK-värjäyksessä tutkittavalle antigeenille suunniteltu vasta-aine viedään kudokseen, jossa se tarttuu tutkittavaan antigeeniin. Muodostunut kompleksi voidaan visualisoida esimerkiksi vasta-aineeseen kiinnitetyn leiman avulla. IHK-värjäyksessä muodostuneesta värin määrästä voidaan osoittaa tietty antigeeni kudoksesta tai sen puuttuminen ja lisäksi havainnoida sen sijaintia ja määrää kudoksessa. (Mäkinen & Stenbäck 2012.)

Opinnäytetyötutkimuksessa IHK-menetelmää verrataan kromogeeniseen in situ hybridisaatioon (KISH). Työssä KISH-menetelmällä tutkitaan syövän taustalla olevia kromosomien rakenteellisia häiriöitä eli translokaatioita, joissa eri kromosomien osat vaihtavat paikkaa (Lehto & Stenbäck 2012a). Opinnäytetyössä KISH-menetelmässä käytettäviä translokaatiokoettimia ovat anaplastinen lymfomakinaasi (ALK1)- ja B-solu lymfoma 2 (BCL2) -koettimet. Koettimet tunnistavat DNA-vaurioita, jotka synnyttävät solukossa syöpäkasvaimelle tyypillisiä ominaisuuksia. Näitä ominaisuuksia ovat muun muassa kyvyttömyys reagoida solunjakautumista rajoittaviin signaaleihin ja kyky välttää ohjelmoitu solukuolema eli apoptoosi. (Isola 2007, 17, 27.) ALK-koetin tunnistaa kromosomissa 2 tapahtuvan ALK-geenialueen muutoksen, joka johtaa syöpää aiheuttavien ominaisuuksien aktivoitumiseen soluissa (Rodig ym. 2009; Palmer, Verneris, Grabbe & Hallberg 2009). BCL2-koetin tunnistaa BCL2-geenin siirtymän kromosomissa 14. Siirtyminen aiheuttaa BCL2-proteiinin ylituotantoa, mikä johtaa normaalin solukuoleman estymiseen. (Harris 2001, 122–123; Macdonald ym. 2004, 177.) Syöpäsoluissa translokaatiokoettimet sitoutuvat DNA:han tunnettuun katkeamiskohtaan. Koettimen kiinnittyminen ja mahdollinen geenimuutos voidaan havaita fluoresoivan aineen tai entsyymaattisessa reaktiossa syntyvän värin avulla. (Knuutila 2012a.)

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimii Kuopion yliopistollisen sairaalan kuvantamiskeskuksen kliinisen patologian yksikkö ja opinnäytetyö liittyy analyysimenetelmän käyttöönottoon patologian

laboratoriossa. Opinnäytetyön tarkoituksena on suorittaa kromogeeninen in situ hybridisaatio (KISH)-menetelmän alustava sisäänajo (optimointi) ja tutkia translokaatiokoettimien ALK1 ja BCL2 toimivuutta formalinifiksoiduilla parafiinileikkeillä. Opinnäytetyön tavoitteena on arvioida KISH-menetelmän hyödynnettävyys KYSin patologian syöpädiagnostiikassa selvittämällä kuinka translokaatiokoettimet saadaan toimimaan käytetyllä näytemateriaalilla ja arvioimalla KISH-menetelmän vastaavuus rutiinikäytössä oleviin immunohistokemiallisiin (IHK) menetelmiin. Vastaavuuden selvittämiseksi KISH-näytteistä etsittiin translokaatioita (geenimuutosta) IHK-näytteissä ALK- tai BCL2-proteiinia ilmentäviltä alueilta. ALK-koettimen toimivuutta tutkittiin neuroblastooman, eipienisoluisen keuhkokarsinooman ja anaplastisen suurisolulymfooman näytteillä ja BCL2-koettimen toimivuutta follikulaarisen lymfooman näytteillä.

Opinnäytetyön aihe ja tavoitteet vastaavat työelämästä nousseeseen tarpeeseen. Opinnäytetyölle asetetuilla tavoitteilla selvitetään KISH-menetelmän hyödynnettävyys KYSin patologian yksikön syöpädiagnostiikassa. Toimiessaan menetelmä voi laajentaa patologian laboratorion tutkimusvalikoimaa ja tarkentaa syöpädiagnostiikkaa. Opinnäytetyön aihe etsittiin oman kiinnostuksen pohjalta. Aihealue on syöpätutkimuksessa ajankohtainen, mikä tekee opinnäytetyöstä erittäin mielenkiintoisen. Opinnäytetyöksi haluttiin vaativa työ, jossa on laaja teoriapohja sekä kiinnostava käytännön työvaihe. Opinnäytetyöllä haluttiin laajentaa omaa tietämystä ja kehittää ammatillista osaamista patologian laboratoriotutkimusprosessissa sekä käytännön laboratoriotyöskentelyssä.

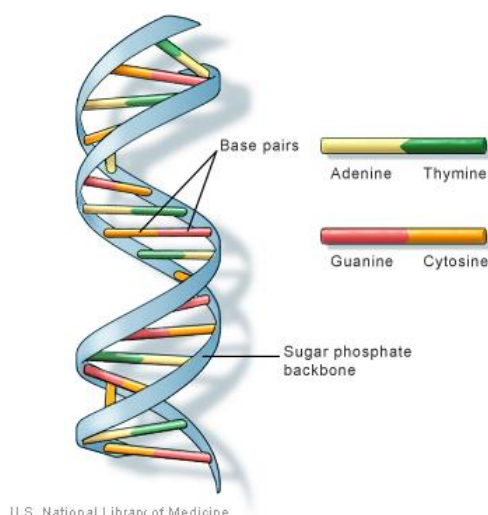


## 2 SYÖVÄN SYNTY ELI KARSINOGENEESI

### 2.1 Syövän syntyprosessi

Syövän syntyä koskevan tiedon perusteella on vaikeaa luoda yleistä syövän syntyteoriaa, ja syövän syntyprosessille onkin olemassa useita eri näkökulmia. Syövän syntyä on pyritty selvittämään koe-eläin- ja soluviljelymallien, molekyylibiologisten havaintojen sekä kliinisten havaintojen perusteella. Yksityiskohtaisinta tietoa syövän syntymekanismeista on saavutettu solu- ja molekyylibiologian menetelmiä hyödyntämällä. Näiden tutkimusten perusteella on löydetty syöpägenejä ja yksittäisiä DNA-vaurioita, joilla on tärkeä patogeneettinen merkitys syövän synnyssä. Syövän syntyteorioille on yhteistä se, että syövän synnyn käsitetään tapahtuvan vaihteittain eri mekanismien kautta. Keskeistä syövän synnyssä ovat juuri solujen DNA-vauriot. (Isola 2007, 17, 20–23.)

Jotta syövän syntyä ja syöpädiagnostisten menetelmien periaatteita pystyy ymmärtämään, on hahmotettava DNA:n rakenne ja toiminta. Yksinkertaisimmillaan kuvattuna DNA (deoksiribonukleiinihappo) sisältää geenit eli perimäaineksen, joka ohjaa organismin kehittymistä ja toimintaa. Solun jakautuessa jokainen syntyvä tytär solu sisältää kopion alkuperäisestä DNA:sta. Geenit ovat osia kaksijuosteisesta DNA:sta, joka sijaitsee solun tumassa. (Campbell 1995, 180.) Yksi DNA-juoste koostuu vaihtelevassa järjestyksessä olevista emäksistä (adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini), jotka sitoutuvat vastakkaiseen DNA-juosteeseen niin, että adeniini (A) sitoutuu aina tymiiniin (T) ja sytosiini (C) guaniiniin (G) (Campbell 1995, 180; Kuva 1). Juosteiden komplementaarisuus tarkoittaa vastinemästen sitoutumista toisiinsa. Geeni on tietyn pituinen DNA-jakso, joka koodaa tiettyä proteiinia. DNA:n emäsjärjestys määrittää proteiinin aminohappojärjestyksen, joka määrittää proteiinin rakenteen ja toiminnan. Geenin emäsjärjestys muunnetaan proteiinisynteesissä proteiinin aminohappojärjestykseksi. (Campbell 1995, 180.) Vauriot geenialueella voivat aiheuttaa geenin emäsjärjestyksen muuttumisen, mikä johtaa virheelliseen proteiinisynteesiin ja proteiinin virheelliseen toimintaan elimistössä. Solujen jakautuessa muutokset siirtyvät syntyviin tytärsoluihin. (Isola 2007, 23, 25.)



Kuva 1 DNA:n rakenne

[viitattu 25.9.2013] Saatavissa: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>

Syöpään johtavia DNA-muutoksia on todettu syntyvän useiden kemikaalien ja fysikaalisten tekijöiden seurauksena. Karsinogeeniset eli syöpää aiheuttavat tekijät jaetaan kemiallisiin ja fysikaalisiin karsinogeeneihin sekä mikrobeihin. Kemiallisia karsinogeeneja ovat pääasiassa syöpää aiheuttavat kemikaalit, joista osa itsessään on karsinogeenisiä ja osa muuttuu karsinogeeniseksi solujen aineenvaihdunnan vaikutuksesta. Fysikaalisista tekijöistä ennen kaikkea säteilyn on todettu aiheuttavan syöpää. (Lehto & Stenbäck 2012b.) Kemiallisten aineiden ja säteilyn ohella virukset ovat tärkeimpiä ihmiselle syöpiä aiheuttavia tekijöitä. Ihmisen kasvainviruksia ovat muun muassa papilloomavirukset (HPV), hepatiitti B- ja C-virukset sekä Epstein-Barrin virus (EBV). (Auvinen & Vaheri 2003, 588–589.) Pienessä osassa, noin 5 %:ssa, syöpiä on todettu selvää tai ilmeistä perinnöllisyyttä (Lehto & Stenbäck 2012c).

Syövän kehittyminen alkaa aina yksittäisessä solussa tapahtuvista muutoksista. Syöpäsolukko alkaa mutaatioiden seurauksena jakaantua kontrolloimattomasti ja ilmenevät DNA-muutokset kertyvät tytärsoluihin kasvaimen kehittyessä. Muutokset lisäävät solujen kasvupotentiaalia ja solukko saa kasvuedun ympäristössään. Yhdestä solusta alkunsa saanut kasvainsolukko kehittyy useimmiten heterogeeniseksi. Tämä tarkoittaa sitä, että solujen ominaisuudet voivat poiketa huomattavasti toisistaan muun muassa mutaatioiden ja immunologisten ominaisuuksien osalta. (Isola 2007, 22; Macdonald ym. 2004, 2.) Kliinisesti todettava ja etäpesäkkeitä lähettävä syöpäkasvain ilmentää syöpäsolukon solubiologisia tyyppiominaisuuksia. Näitä ominaisuuksia ovat kyky tuottaa itse tarvitsemansa kasvusignaalit, kyvyttömyys reagoida solunjakautumista rajoittaviin ulkoisiin signaaleihin, kyky välttää ohjelmoitu solukuolema (apoptoosi), rajoittamaton solunjakautumisen määrä, kasvaimen verisuonimuodostus (angiogeneesi) ja tunkeutuminen ympäröiviin kudoksiin sekä kyky muodostaa metastaaseja. Syöpäkasvaimen kasvu riippuu solujen jakautumisnopeudesta, jakautumissyklin oikeassa vaiheessa olevien solujen määrästä ja solujen apoptoosista eli solukuolemasta. (Isola 2007, 17, 27.)

Elimistössä tapahtuu jatkuvasti solujen uusiutumista. Aikuisessa normaali solujen jakautumisaktiivisuus on vilkasta vain ihon pintakerroksen soluissa, keuhkoputkissa, mahalaukun ja suolen seinämän pintasolukossa ja verisuonisoluissa (Isola 2007, 28). Normaali solunjakautumissykli on hienovaraisesti säädelty tasapainotila solunjakautumisen ja solukuoleman välillä (Böhm & Kosma 2013; Macdonald ym. 2004, 1). Tasapainossa tapahtuu normaalisti muutoksia vain, kun tarvittava uusien solujen määrä kasvaa esimerkiksi haavan parantuessa. Solujen erilaistuminen tämän prosessin aikana tapahtuu ennalta säädetyn mallin mukaisesti ja se lakkaa, kun sitä ei enää tarvita. (Macdonald ym. 2004, 1.) Solunjakautumisen säätelyn pettäminen on yksi keskeinen prosessi syövän synnyssä (Isola 2007, 28).

Kasvaimen kasvunopeus riippuu solunjakautumisen lisäksi siitä, kuinka suuri osa syöpäsoluista kuolee (Isola 2007, 29). Apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman häiriöiden uskotaan olevan merkittävä tekijä useiden eri syöpätautien synnyssä. Kyvyttömyys eliminoida apoptoosin avulla solut, joiden DNA on vioittunut, johtaa useimpien pahanlaatuisten kasvainten syntyyn. (Carton, Daly & Ramani 2007, 8.) Normaleissa soluissa apoptoosi on hienovarainen ja kontrolloitu solukuoleman muoto, jonka avulla elimistö poistaa tarpeettomiksi käyneet tai vioittuneet solut (Isola 2007, 29).

Apoptoosin voivat käynnistää muun muassa fysiologiset ja elimistön kehitykseen liittyvät signaalit, tulehdukseen liittyvät tapahtumat ja DNA:n vaurioituminen. Apoptoosissa solut lakkauttavat oman toimintansa tuottamalla DNA:ta ja proteiineja tuhoavia entsyymejä. (Isola 2007, 29.) Apoptoosin käynnistyttyä solut kutistuvat ja niiden tuma pirstoutuu. Tämän jälkeen kuollut solu hajoaa kappaleiksi, joilla jokaisella on ehyt solukalvo. Hajonneiden kappaleiden solukalvoissa on markkereita, joiden perusteella ympäröivät solut fagosytoivat ne. Apoptoosin kannalta tärkeimmät vaiheet tapahtuvat mitokondrioissa. Mitokondrioista vapautuu säätelytekijöitä, jotka aktivoivat solutuhon. Säätelytekijät aktivoivat entsyymejä, jotka hajottavat solun tukirakenteet ja DNA:n. (Carton ym. 2007, 8; Isola 2007, 30.)

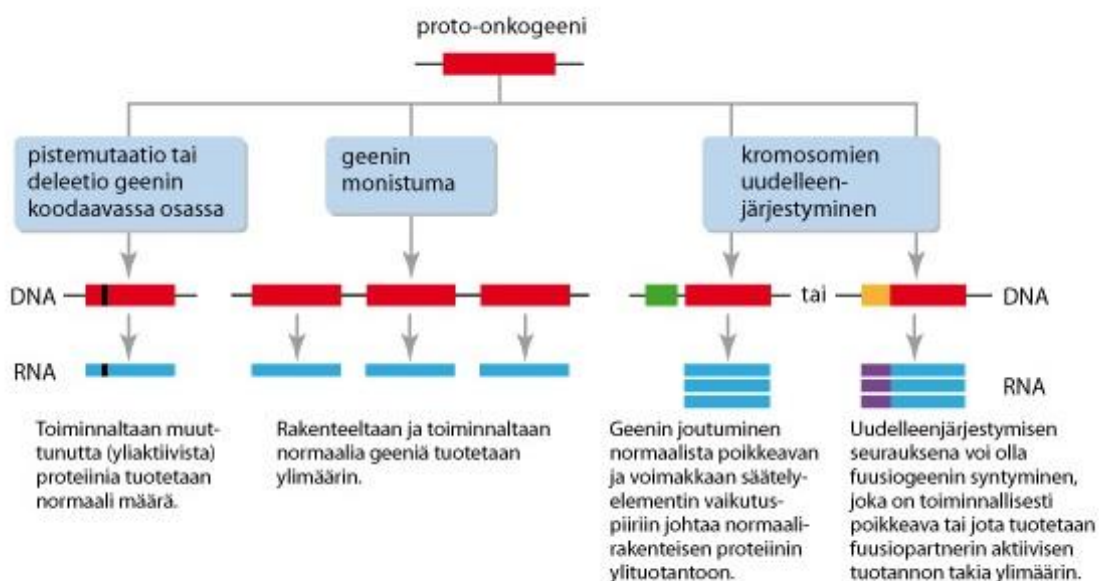
## 2.2 DNA- ja kromosomimuutokset syövän synnyssä

Syövän syntyyn vaikuttavat DNA-vauriot kohdistuvat geeneihin, joiden virheellinen toiminta johtaa välivaiheiden kautta syöpäsolukon syntyyn. Näitä geenejä kutsutaan syöpägeeneiksi eli onkogeeneiksi ja niitä tunnetaan yli 50 kappaletta. (Isola 2007, 25.) Onkogeenien varsinainen tehtävä ei ole tuottaa syöpäkasvua, vaan ne ovat normaalisti toimiessaan solun normaalia kasvunsäätelyä koodaavia geenejä. Elimistössä onkogeenien normaalisti toimivia vastingeenejä kutsutaan proto-onkogeeneiksi eli esisyöpägeeneiksi. (Lehto & Stenbäck 2012a.) Syöpägeenien kaksi päätyyppiä ovat onkogeenit, joiden aktivoituminen johtaa syövän syntyyn, ja kasvurajoitegeenit, joiden syöpää aiheuttava vaikutus perustuu näiden geenien toiminnan häviämiseen (Isola 2007, 25).

Proto-onkogeeni voi aktivoitua onkogeeniksi geenin rakenteellisten muutosten, geenimonistuman, geenin epäasianmukaisen ilmentymisen tai kromosomin rakenteellisen muutoksen seurauksena (Kuva 2). Geenin pistemutaatioita, joissa yhden emäksen muuttuminen synnyttää yhden aminohapon osalta virheellisen proteiinin, tavataan useissa onkogeeneissa (Macdonald ym. 2004, 26). Geenin rakenteessa tapahtuvia mutaatiotyypppejä ovat missense-mutaatio, nonsense-mutaatio ja geenin lukukehystä muuttava yhden emäksen häviäminen (deleetio) tai lisääminen (insertio). Missense-mutaatiossa yhden emäsparin muutos johtaa yhden aminohapon osalta virheelliseen proteiiniin. Nonsense-mutaatio aiheuttaa proteiinin lyhenemisen keskeytyneen proteiinisynteesin seurauksena. Yhden emäksen deleetio tai insertio muuttaa geenin lukukehystä, jolloin geenin tuottama valkuaisaine on täysin virheellinen. Kiinteissä kasvaimissa onkogeenin aktivoitumisen taustalla on usein geenin monistuminen, joka tapahtuu virheellisen DNA:n kahdentumisen seurauksena, ja synnyttää tytärsoluihin useita kymmeniä kopioita onkogeenistä. (Isola 2007, 23, 25.) Onkogeenin voi aktivoida myös proto-onkogeenin epäasianmukainen ilmentyminen ajallisesti tai paikallisesti, mikä tarkoittaa esimerkiksi kasvutekijägeenin ilmentymistä solussa, jossa se ei normaalisti ilmene (Lehto & Stenbäck 2012a).

Onkogeenin aktivoitumisen voivat aiheuttaa myös kromosomien katkeamisesta ja uudelleenjärjestymisestä johtuvat rakennehäiriöt. Inversiossa kromosomin osa vaihtaa paikkaa kahden katkoksen seurauksena. (Lehto & Stenbäck 2012e.) Kromosomaalisissa translokaatioissa syöpägeenin siirtyminen toisen geenin säätelyalueen yhteyteen voi lisätä syntyvän proteiinituotteen määrän moninkertaiseksi (Isola 2007, 23). Kromosomien translokaatioilla on merkittävä rooli lymfoproliferatiivisten sai-

rauksien sekä kiinteiden kasvainten synnyssä. Translokaation seurauksena syntyy usein yhdistelmägeenejä eli fuusiogeenejä. Nämä geenit yhdessä koodaavat yhdistelmäproteiineja eli fuusioproteiineja, joilla on onkogeneettisiä ominaisuuksia. (Lamant ym. 2000.)



Kuva 2 Proto-onkogeenien aktivoitumisen mekanisme (Lehto & Stenbäck 2012a)

### 3 SYÖPÄDIAGNOSTISET MENETELMÄT

Syöpädiagnoosi tehdään lähes aina perustuen mikroskooppiseen tutkimukseen, joka voi olla histologinen, sytologinen tai jokin patologian erikoistutkimus. Tavanomaisin syöpädiagnoosi on histologinen diagnoosi, joka perustuu kudoksen rakenteen mikroskooppiseen tarkasteluun. Diagnoosi perustuu histokemiallisiin värjäyksiin ja syöpäsolujen kokoon ja muotoon. Syöpädiagnoosi voidaan tehdä myös sytologisesta näytteestä, joita ovat esimerkiksi irtosolunäytteet. Tällöin diagnoosi perustuu yksittäisiin soluihin ja soluryhmiin. Tarkempia menetelmiä ovat immunohistokemialliset, sytogeneettiset ja molekyylogeneettiset menetelmät, joilla päästään aiempaa varmempaan ja tarkempaan diagnoosiin. (Franssila 2007, 82, 89.) Tässä opinnäytetyössä käytettyjä menetelmiä ovat immunohistokemiallinen menetelmä ja kromogeeninen in situ hybridisaatio. Immunohistokemiallisella värjäyksellä tutkitaan tiettyjen proteiinien tuottoa kudoksessa ja kromogeenisellä in situ hybridisaatiolla DNA-muutoksia syövän takana (Macdonald ym. 2004, 252, 257).

#### 3.1 Histologisen näytteen kudosprosessointi

Kasvainten histologinen diagnoosi perustuu muun muassa patologin tulkintaan kasvaimessa havaittavista solutason muutoksista eli morfologiasta, mutta ennen kuin histologista näytettä voidaan tarkastella mikroskooppisesti, se on käsiteltävä tietyllä tavalla (Ristimäki, Frassila & Kosma 2012). Histologisen näytteen kudosprosessoinnin vaiheet ovat fiksointi, käyntiinpano eli dissekointi, kuduskuljetus, näytteen valu parafiiniin, leikkeiden tekeminen ja kiinnittäminen objektilasille sekä näytteitten värjääminen ja näytelasien päällystäminen. Kun näyte irrotetaan elimistöstä, se tulee fiksoida tai jäädyyttää mahdollisimman nopeasti. Tällä pyritään minimoimaan solujen ja solunulkoisten rakenteiden muuntuminen. (Kiernan 2008, 6.) Yleisin käytössä oleva fiksatiivi on 10-%:nen neutraalipuskuroitu formaliini (formaldehydi), joka muodostaa kudokseen sidoksia aminohappojen välille. Fiksaation tarkoituksena on säilyttää kudoksen proteiinirakenteet eli kudoksen antigeenisyyys sekä mahdollistaa reagenssien pääsy kudokseen. Yleensä fiksatiivi kovettaa kudosta, mikä helpottaa makroleikkelyä eli kudoksen leikkaamista pienemmiksi paloiksi ennen kudokäsittelyä. (Farmilo & Stead 2009, 27–29; Kiernan 2008, 6, 12, 27.)

Fiksoinnin nopea aloittaminen ja oikeanlainen fiksointi ovat ratkaisevia kudoksen onnistuneen värjäyksen saavuttamiseksi. Kudoksen hajoaminen alkaa heti, kun se leikataan irti elimistöstä, joten fiksoinnin nopea aloittaminen on tärkeää. Oikealla fiksatiivilla, riittävällä fiksointiajalla ja kudusdissekoinnilla varmistetaan kudosten riittävä fiksoituminen. (Farmilo & Stead 2009, 29–32.) Fiksoitumiseen vaikuttavat kudostyyppi ja kudospalan koko. Pieni kudospala fiksoituu nopeammin, koska fiksatiivi pystyy läpäisemään kudoksen helpommin. Lisäksi fiksaatioon vaikuttavat fiksaatioaika ja lämpötila sekä liian lyhyt että liian pitkä fiksaatioaika voivat aiheuttaa ongelmia. Liian lyhyt fiksaatio voi aiheuttaa fiksoimattoman kudoksen fiksoitumisen myöhemmin dehydraatiossa etanolilla. Tämä voi aiheuttaa vaihtelevaa immunoreaktiivisuutta kudoksessa, koska osa antigeeneistä huuhtoutuu pois. Liian pitkä fiksaatioaika voi johtaa kudoksesta tutkittavien osien (epitoppien) peittymiseen formaliinifiksoinnin muodostamien sidosten takia. (Farmilo & Stead 2006, 27; Kiernan 2008, 6,

12.) Fiksaatiossa käytetään formaliinin lisäksi monia erilaisia menetelmiä, mutta tähän mennessä yksikään fiksatiivi ei ole osoittautunut täysin ideaaliseksi kaikille käyttösovelluksille (Farmilo & Stead 2006, 27–28).

Histologinen näyte saapuu patologian laboratorioon useimmiten fiksatiivissa. Näytteen tie laboratoriossa alkaa kirjaamisesta, jossa näyte kirjataan sisään näytenumerolla ja lähetetiedoilla (muun muassa näytetyyppi, näytteenotto kohta ja päivämäärä). Suuremmat kirurgiset näytteet vaativat käyntiinpanon eli dissekoinnin ennen kuduskuljetusta. Käyntiinpanossa kudos valokuvataan tai piirretään, jotta näytteen tutkiminen jatkossa onnistuu paremmin. Lisäksi kudos viipaloidaan kokonaan, tai siitä valitaan edustavat palat kuduskasetteihin. Pienet näytteet, kuten biopsiat ja eturauhasen höyläysnäytteet, eivät vaadi käyntiinpanoa, vaan ne laitetaan suoraan näytekasettiin ja kuduskuljetusautomaattiin, jossa tapahtuu kudosten prosessointi. (Mäkinen 2012.) Kuduskuljetuksessa kudorakenteet valmistetaan parafiinivalua ja leikkausta varten. Kuljetuksen ensimmäisessä vaiheessa kudokset upotetaan fiksatiiviin fiksaation loppuun saattamiseksi. Seuraavaksi kudoksen vesi poistetaan dehydraatiossa nousevalla alkoholisarjalla, mitä seuraa kudoksen kirkastaminen ksyleenillä, minkä jälkeen kudos kyllästetään sulalla parafiinilla. Ksyleeni tarvitaan kirkasteeksi, koska vettä poistava alkoholi ei kykene muodostamaan sulan parafiinin kanssa homogeenistä liuosta. Ksyleeni muodostaa homogeenisen liuoksen parafiinin kanssa mahdollistaen parafiinin imeytymisen kudokseen. (Kiernan 2008, 53–54.)

Kudoskuljetuksen jälkeen näytteet valetaan parafiiniin, joka kovettuessaan kudosten sisään ja ympärille mahdollistaa ohuiden 3–4 µm paksuisten leikkeiden leikkaamisen mikrotomilla (Mäkinen 2012). Näytelasille leikatut leikkeet kiinnitetään objektilasille 37-°C:ssä lämpökaapissa yön yli tai 60-°C:ssä uunissa tunnin ajan (Dako 2012a). Kiinnitetyille näytteille tehdään tarvittavat värjäykset. Suomessa yleisimmin käytössä oleva perusvärjäys on hematoksyliini-eosiini-värjäys (HE). Erikoisvärjäyksiä käytetään esimerkiksi maksa-, munuais- ja luuydinbiopsioiden diagnostiikassa. Kaikista patologian laboratorioon lähetteellä tulevista näytteistä tehdään patologin arvion mukainen patologisanatomisen lausunto ja diagnoosi (PAD). (Mäkinen 2012.)

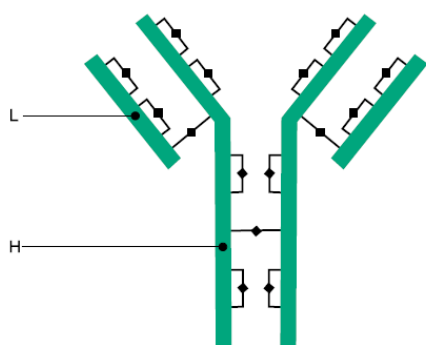
Tutkimuskäyttöön voidaan valmistaa monikudosblokkeja, joihin voidaan kerätä satoja erillisiä näytteitä useilta eri potilailta. Monikudosblokit kehitettiin alun perin immunohistokemiallisten värjäysten validointiin. Validointi vaatii useiden satojen näytteitten värjäämistä, joten yksittäisten blokkien leikkaaminen ja värjääminen on aikaavievää. Multiblokit mahdollistavat useiden näytteitten halvan ja nopean analysoinnin. (Saxena & Badves 2009, 44.)

### 3.2 Immunohistokemia

Diagnostisen immunohistokemian (IHK) kaksi pääkäsitettä ovat antigeeni ja vasta-aine. Menetelmässä vasta-aineita käytetään antigeenien eli solujen toiminnan merkkiaineiden, kuten apoptoosin ja solusyklin eri vaiheisiin liittyvien proteiinien, tarkasteluun kudoksesta. IHK-menetelmällä pyritään osoittamaan kudoksesta tietty antigeeni tai sen puuttuminen ja tarkastelemaan sen sijaintia ja määrää soluissa tai kudoksessa. (Mäkinen & Stenbäck 2012.) Vasta-

aineen tietty rakenneosaa eli paratooppi tarttuu antigeenin epitoopiksi kutsuttuun rakenneosaan. Erilaisia antigeenejä ja niille spesifisiä vasta-aineita on olemassa miljoonia. (Seppälä 2003, 624.)

Vasta-aineet ovat elimistön immuunireaktioihin liittyviä proteiineja, joiden perusrakenne on Y-kirjaimen muotoinen molekyyli, joka koostuu kahdesta H-polypeptidiketjusta (raskasketjut) ja kahdesta L-polypeptidiketjusta (kevytketjut) (Boenisch 2009a, 1; Delves, Martin, Burton & Roitt 2006, 38; Kuva 3). Rakenteen Fc-osaksi kutsuttu häntäosa on rakenteeltaan pysyvämpi ja toimii kiinnittymiskohtana esimerkiksi fagosyyteille. Fab-osaksi kutsutut Y-rakenteen haarat muodostavat vasta-aineen sitovan osan, jonka rakenne vaihtelee sidottavan antigeenin mukaan. (Carton ym. 2007, 38.) Jos vasta-aine sitoutuu tutkittavan antigeenin epitooppien kaltaisiin rakenteisiin, syntyneen sidoksen pysyvyys eli affiniteetti on heikko. Vasta-aineen spesifisyys antigeenille tarkoittaa suurta affiniteettia eli voimakasta molekyylien välistä vetovoimaa. Yleensä tämä tarkoittaa sitä, että vasta-aineen sitoutumiskohta eli paratooppi sopii erittäin hyvin antigeenin epitooppiin eikä luultavasti sitoudu muualle. (Delves ym. 2006 92, 111–112.) IHK-värjäykset perustuvat antigeenien ja vasta-aineiden väliseen affiniteettiin eli molekyylien väliseen vetovoimaan (Kiernan 2008, 483; Mäkinen & Stenbäck 2012).



Kuva 3 Vasta-aineen rakenne,  
L=kevytketju H=raskasketju (Boenisch 2009a, 1)

Vasta-aineita on olemassa polyklonaalisia ja monoklonaalisia. Polyklonaaliset vasta-aineet pystyvät sitoutumaan saman antigeenimolekyylin eri epitooppeihin tai sitomaan useita eri antigeenejä. Monoklonaaliset vasta-aineet puolestaan ovat yhden solukloonin tuottamia vasta-aineita, jotka ovat immunokemiallisesti identtisiä ja sitoutuvat tietyn antigeenin yhteen epitooppiin. Näiden ominaisuuksien vuoksi monoklonaaliset vasta-aineet ovat polyklonaalisia spesifisempiä. Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan yleensä jäniksissä tai hiirissä. Nämä eläimet immunisoidaan injektoidulla niihin haluttua immunogeeniä, jota vastaan eläimen immunipuolustus valmistaa vasta-aineita. Kun eläimen on todettu immunisoituneen, se lopetetaan ja eläimen B-lymfosyytit eristetään. Eristetyt B-lymfosyytit yhdistetään kuolemattomien myeloomasolujen kanssa. Näin fuusoidut solut saadaan tuottamaan haluttua immunoglobuliinia kuolemattomassa soluviljelmässä. Polyklonaalisten vasta-aineiden tuotto tapahtuu yleensä jäniksissä. Polyklonaaliset vasta-aineet tuotetaan eläimen eri B-solu klooneissa ja tästä syystä tuotettavat immunoglobuliinit ovat immunokemiallisesti erilaisia. (Boenisch 2009a, 3–4.)

IHK-värjäysprosessia varten näytteet yleensä formaliinifiksoidaan ja valetaan parafiiniin. Yleisesti on todettu, että formaliinifiksoidut ja parafiiniin valetut kudokset ovat melko soveliaita immunohistokemiallisille määrittämisille (Nadji 2006, 36). Yhtenä haasteena immunohistokemiallisissa värjäyksissä on se, että näytteen käsittely ja itse IHK-värjäysprosessi sisältävät kudoksentuhoavia vaiheita. Erityisesti fiksaatiovaihe on haastava, koska siinä tarkoituksenmukaisesti pyritään muuttamaan kudoksen proteiinin rakennetta sen suojaamiseksi näytteenoton jälkeiseltä hajoamiselta. Sen lisäksi, että fiksaatio voi tuhota antigeenejä, se voi myös aiheuttaa antigeenien siirtymisen esimerkiksi tumasta sytoplasmaan tai muuttaa niiden kolmiulotteista rakennetta. Fiksaation jälkeisellä kudoksentutkimuksella ei tunneta olevan paljoa vaikutusta antigeenien säilymiselle. Kudoksen kuivuminen kudoksentutkimuksen aikana on yksi tekijä, joka voi vahingoittaa näytettä. (Farmilo & Stead 2009, 29–32.)

Formaliinifiksaation ja parafiinivalun takia näytteet tulee esikäsittää ennen IHK-värjäystä, sillä formaliinifiksaatio on vaikuttanut antigeenien epitoppeihin. Muuntuneet antigeeniepitopit eivät reagoi IHK-värjäyksessä käytettävien vasta-aineiden paratooppien kanssa. (Kumar & Rudbeck 2009, 51.) Peittyneet epitopit paljastetaan lämpökäsittelyllä (HIER), jossa formaliinifiksoinnissa syntyneet sidokset hajotetaan ja näytteisiin palautetaan vesi (rehydraatio). Termi HIER tulee sanoista "heat-induced epitope retrieval". Sen rutiinikäytön on huomattu vähentävän fiksaatioajan muutosten aiheuttamia vaihtelevia IHK-värjäystuloksia. Esikäsittelyssä käytettäviä puskureita on useanlaisia. Yleisesti käytetty puskuri on sitraattipuskuri (pH 6), mutta korkeamman pH:n on todettu sopivan useammille antigeeni-vasta-aine-pareille. Esikäsittelyn tehoon vaikuttavaa esikäsittelyliuoksen pH:n lisäksi esikäsittelylämpötila, esikäsittelyaika ja puskurin koostumus. (Kumar & Rudbeck 2009, 51–52.)

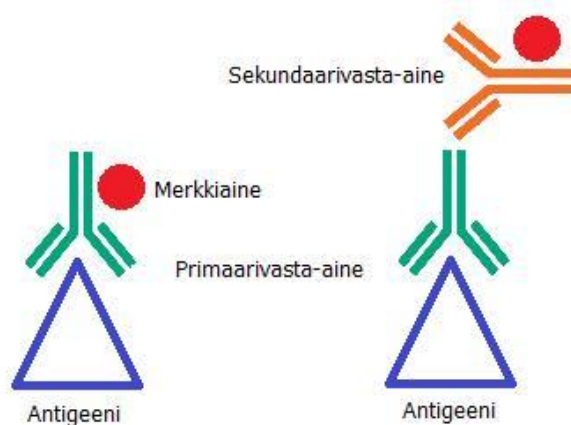
Esikäsittelyn jälkeen värjättävistä näytteistä poistetaan solujen omat peroksidaasit eli endogeeniset peroksidaasit, jotka muistuttavat värjäyksessä käytettäviä entsyymejä. Peroksidaasientsyymejä on esimerkiksi punasoluissa ja granulocyteissa ja ne tulee poistaa, jotta ne eivät häiritse IHK-värjäyksen kromogeenista reaktiota. Vaihetta kutsutaan peroksidaasiblokkaukseksi. (Farmilo & Stead 2009, 31; Pace 2009, 110.)

IHK-värjäyksessä primaarivasta-aineella tunnistetaan kudoksesta tai solunäytteestä tutkittava antigeeni. Vasta-aine muodostaa antigeenin kanssa antigeeni-vasta-aine-kompleksin. Kompleksi voidaan osoittaa esimerkiksi suoralla osoitusmenetelmällä liittämällä primaarivasta-aineeseen merkkiaine tai epäsuorasti sekundaarivasta-ainetta käyttämällä. Epäsuorassa menetelmässä primaarivasta-aineeseen tarttuu leimattu sekundaarivasta-aine. (Kuva 4.) Muodostunut kompleksi saada näkyville entsyymillä, substraatin ja väriaineen (kromogeeni) avulla entsyymi-substraatti-reaktiossa. (Kiernan 2008, 499; Mäkinen & Stenbäck 2012.) Entsyymi-substraatti-reaktion seurauksena IHK-värjäyksessä reaktiopaikalle syntyy värillinen lopputuote kromogeenin hapettuessa. Syntynyt väri voidaan havaita valomikroskooppilla. (Henriksen, Müller & Schönau 2009, 97.)



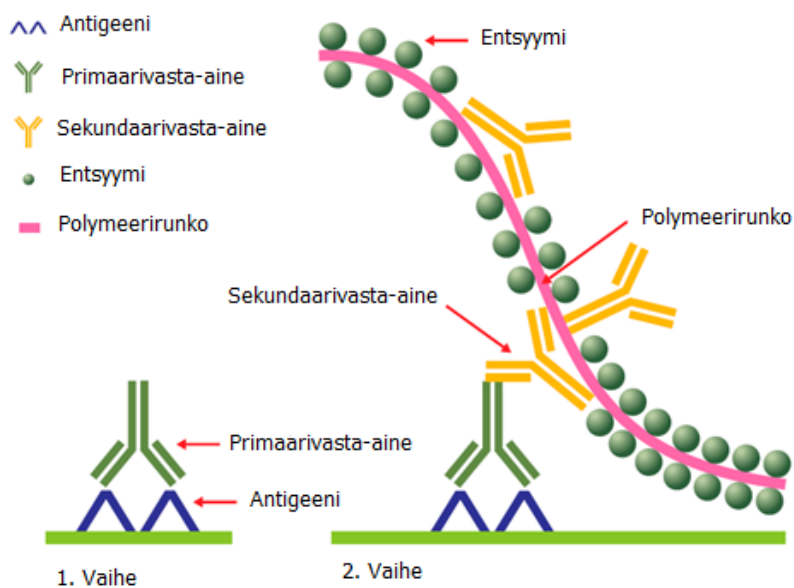
Entsyymi-substraatti-reaktio voidaan kuvata seuraavasti:

1. Entsyymi (E) + Substraatti (S) = ES-kompleksi
2. ES → E + Lopputuote (Boenisch 2006, 19).



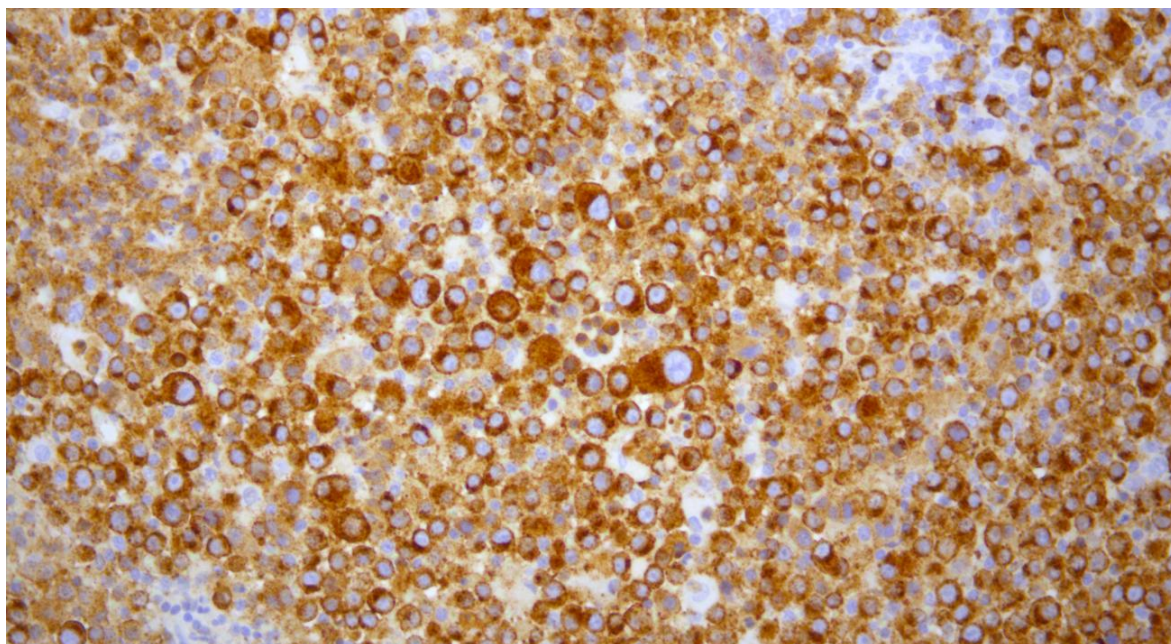
Kuva 4 Suora ja epäsuora antigeenitunnistus  
(mukaillen Kiernan 2008, 493–494)

Vasta-aineen tarttuminen antigeeniin voidaan osoittaa kudoksesta myös opinnäytetyötutkimuksessa käytetyllä epäsuoralla kaksivaiheisella polymeerimetodilla. Siinä primaarivasta-aineeseen tarttuvaan sekundaarivasta-aineeseen on liitetty pitkä polymeerirunko, jossa on kiinni useita muita sekundaarivasta-aineita ja entsyymi-substraatti-reaktioon tarvittavaa entsyymiä. Polymeerirunkoon kiinnitetty sekundaarivasta-aine tunnistaa primaarivasta-aineen. (Kuva 5; LIITE 5.) Näytteeseen lisätään kromogeeni, joka hapettuu entsyymireaktiossa muodostaen reaktipaikalle värillisen lopputuotteen (Henriksen ym. 2009, 97). Polymeerimetodin käyttö lisää detektiosysteemin herkkyyttä. Menetelmän etuja muihin monivaiheisiin detektiomenetelmiin nähden ovat sen yksinkertaisuus ja herkkyys. Molemmat ominaisuudet mahdollistavat voimakkaamman värjäystuloksen. (Ramos-Vara 2005.)



Kuva 5 Epäsuora kaksivaiheinen polymeeridetektio (mukaillen Key 2009, 59)

IHK-värjäyksissä käytettäviä detektiomenetelmiä, erilaisia entsyymi-substraatti-pareja ja väriaineita on olemassa useita. Käytetyimpiä entsyymejä ovat alkaalinen fosfataasi (AP) ja piparjuuri-peroksidaasi (HRP). Piparjuuriperoksidaasin substraattina käytetään usein vetyperoksidia ( $H_2O_2$ ). Kromogeenina käytetty DAB (3-3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride) muodostaa hapettuessaan reaktiopaikalle ruskean lopputuotteen. (Boenisch 2009b, 15, 22.) Alla olevassa kuvassa (Kuva 6) näkyy IHK-värjäys, josta nähdään ALK-proteiinin tuotto (ruskea) anaplastisen suurisolulymfooman näytteessä.



Kuva 6 ALK-proteiinin tuotto anaplastisessa suurisolulymfoomaassa (ALCL 2), IHK-värjäys (20x)

### 3.3 Kromogeeninen in situ hybridisaatio

Kromogeeninen in situ hybridisaatio (KISH) kuuluu molekyylysytogeneettisiin menetelmiin, joita käytetään syöpien ja geneettisten sairauksien taustalla olevien geen- ja genomipoikkeavuuksien, kuten monistumien, deleetioiden ja siirtymien, löytämiseen. (Isola & Tanner 2004; Knuutila 2012). Molekyylysytogeneettiset menetelmät perustuvat in situ hybridisaatioon, jossa DNA-koetin sitoutuu eli hybridisoituu sopivissa oloissa sen emäsjaksoa vastaavaan (komplementaariseen) alueeseen kohdesolun DNA:ta. Jotta geenimuutoksen havaitseva koetin pääsee hybridisoitumaan DNA:han, näyte tulee denaturoida eli pilkkoa DNA-juoste yksijuosteiseksi. Kun koettimen sitoutuminen visualisoidaan entsyymaattisessa reaktiossa syntyneen värin avulla, puhutaan kromogeenisestä in situ hybridisaatiosta. Sitoutunut koetin voidaan havaita myös fluoresoivan väriaineen aikaansaamaan fluoresenssin avulla, jota käytetään fluoresenssi in situ hybridisaatiossa (FISH). (Knuutila 2012a.)

KISH-menetelmä on FISH:n rinnalle hiljattain kehitetty syöpädiagnostinen menetelmä (Knuutila 2012). Viime vuosikymmeninä KISH on tutkimusten myötä kehittynyt merkittävästi ja menetelmässä käytettävät koettimet ja leimausmenetelmät ovat kehittyneet havaitsemaan entistä tehokkaammin erilaisia geenimuutoksia (Harvey & Schönau 2006, 89). Yksi melko tuoreista koettimen visualisointitavoista on opinnäytetyötutkimuksessakin käytetty Dakon DuoCISH<sup>TM</sup>-menetelmä, jossa

FISH-koetinten fluoresoivat signaalit muunnetaan kromogeenisiksi signaaleiksi kaksivaiheisella IHK-värjäyksellä (Dako 2012a). KISH-menetelmässä kromogeenisia signaaleja voidaan tarkastella fluoresenssimikroskoopin sijasta tavallisella valomikroskoopilla. Menetelmän huomattavia etuja FISH-menetelmään nähden ovatkin geneettisen informaation ja solumorfologian samanaikainen tarkastelu sekä kromogeenisten signaalien pidempi säilyvyys fluoresoiviin signaaleihin nähden. (Henriksen ym. 2009, 97.)

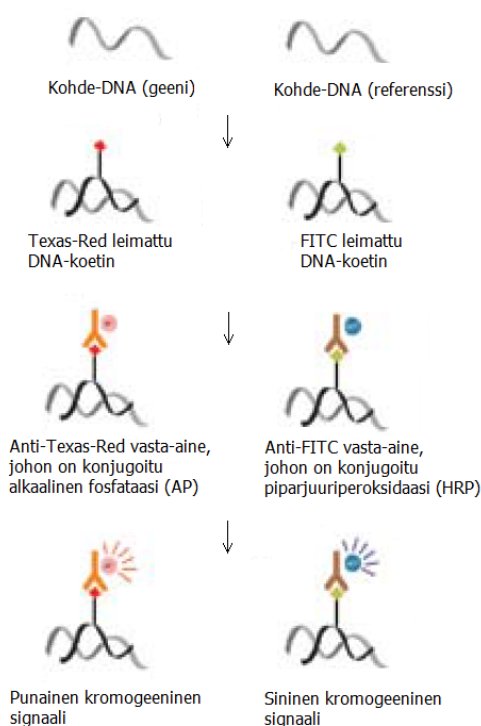
Formaliinifiksaatiosta johtuen KISH-näytteet tulee esikäsittää värjäyksen onnistumiseksi. Formaliinifiksoitujen ja parafiiniin valettujen näytteitten on todettu soveltuvan FISH-värjäykseen, joten niiden voidaan olettaa soveltuvan lähes identiseen KISH-värjäykseen. Formaliinifiksaatio soveltuu KISH-näytteille hyvin, koska se säilyttää kudoksen morfologian, mutta toisaalta formaliinifiksaation luomat makromolekulaariset sidokset vaikeuttavat huomattavasti koettimien pääsyä kohde-DNA:han. Tämän vuoksi näytteet esikäsittellään parafiinin poiston (ksyleeni) ja rehydraation eli veden lisäämisen (nouseva etanolisarja) jälkeen lähes sadan asteen lämpötilassa. Esikäsittelyn tarkoituksena on helpottaa myöhempää proteaasikäsittelyä hajottamalla formaliinin luomia sidoksia. (Müller, Matthiesen & Nielsen 2009, 67–68; Dako 2012a.) Parafiinin poiston lisäksi esikäsittely rehydroidi näytteet ja paljastaa peittyneet epitoopit. Tässä opinnäytetyössä käytetyt Dakon TRISH/EDTA pH 9 ja sitraattipuskuri pH 6 ovat 3-in-1 puskureita, jotka käsittelevät näytteet kolmella edellä kuvatulla tavalla samanaikaisesti. (Dako 2007.) Puutteellinen esikäsittely voi heikentää signaalien voimakkuutta, kun taas liian voimakas esikäsittely voi tuhota solujen morfologian. Oikeanlaisella esikäsittelyllä on valtava vaikutus värjäyksen onnistumiseen. (Dako 2012a; Müller ym. 2009, 67–68.)

Esikäsittelyä seuraa näytteitten proteaasikäsittely eli digestio (pepsiinillä tai proteaasiA:lla), jossa hajotetaan kudoksen omia proteiineja, jotta koettimet pääsisivät solujen tumiin ja hybridisoitumaan DNA:han. Vaihtoehtoisia suoritustapoja proteaasikäsittelylle on olemassa useita, joista esimerkkeinä inkubaatio huoneenlämmössä, inkubaatio 37 °C:ssa ja inkubaatio 37-°C:ssa pepsiiniliuoksessa. (Dako 2012a.) Proteaasikäsittely pitää suhteuttaa kudoksen fiksaatioaikaan. Pitkään fiksoituneet näytteet vaativat pidemmän digestioajan kuin lyhympään fiksoituneet. Useilla näytteillä fiksaatioaika ei ole tiedossa, joten digestioaika täytyy pystyä päättämään kudoksen ja näytteen laadun mukaan. Jos proteaasikäsittely on liian lyhyt, näytteeseen jää paljon proteiineja ja peptidiketjuja, mikä vaikeuttaa koettimien hybridisoitumista kohde-DNA:n kanssa. Tämä aiheuttaa heikot signaalit tai signaalien puuttumisen. Liian pitkä proteaasikäsittely puolestaan tuhoaa kudosta, soluja ja tuman morfologiaa sekä hävittää DNA:ta. (Müller ym. 2009, 67–68.)

Proteaasikäsittelyn jälkeen näytteet dehydroidaan eli kudoksista poistetaan vesi nousevassa alkoholisarjassa. Tämän jälkeen näytteisiin lisätään koettimet. Lämpökäsittelyä varten näytteet peitetään peitinlaseilla, jotka tiivistetään tiivistaineella. Tämä estää koettimien haihtumisen lasilta denaturoinnin ja hybridisaation aikana. Koettimien lisäyksen jälkeen näytteet denaturoidaan korkeassa lämpötilassa, mikä erottaa DNA-juosteet toisistaan ja mahdollistaa koettimien hybridisaation DNA:han. Itse hybridisaatio tapahtuu hybridisaatiokammiossa yön yli. (Dako 2012a.)

Hybridisaation jälkeen näytteistä poistetaan peitinlasit ja niistä pestään sitoutumattomat ja väärin sitoutuneet koettimet Stringent-pesupuskurilla (Dako 2012a). KISH-protokollan viimeisessä vaiheessa näytteet värjätään Dako Denmark A/S:n kehittämän DuoCISH™ dual-color-menetelmän mukaan. Värjäyksen vaiheita ovat solujen omien peroksidaasien poisto (peroksidaasiblokkaus), vasta-aineliuoksen lisääminen, kromogeenien lisääminen ja tarvittaessa taustavärjäys hematoksyliinillä. DuoCISH™-menetelmä mahdollistaa kahden eri värisen kromogeenisen signaalin samanaikaisen tarkastelun samalta näytelasilta. Menetelmällä voidaan nähdä näytteeseen lisättyjen DNA-koettimien sijoittuminen soluissa samanaikaisesti ja todentaa mahdollinen geenimuutos, kuten translokaatio. (Henriksen ym. 2009, 97.)

Dako DuoCISH™-kitti sisältää reagenssit, joilla visualisoidaan fluorokromeilla Texas Red ja FITC leimatut DNA-koettimet (Dako 2012b). Kitti sisältää valmiin CISH Antibody -mixin, jolla muutetaan fluoresoivat Texas Red- (punainen) ja FITC-leimatut (vihreä) koettimet punaisiksi ja sinisiksi kromogeenisiksi signaaleiksi immunohistokemiallisessa värjäyksessä. Kromogeenit saadaan näkyviksi entsyymireaktiolla. Texas Red -leimattuun DNA-koettimeen tarttuu anti-Texas Red -vasta-aine, johon on konjukoitu alkalinen fosfataasi (AP). Näytteeseen lisätty punainen kromogeeni (Fast Red) toimii entsyymireaktiossa substraattina. FITC-leimattuun DNA-koettimeen puolestaan tarttuu anti-FITC-vasta-aine, johon on konjukoitu piparjuuriperoksidaasi (HRP). Näytteeseen lisätty sininen kromogeeni (syaniininsininen) toimii reaktiossa substraattina. (Henriksen ym. 2009, 98.) Entsyymireaktiossa syntynyt lopputuote nähdään värillisenä signaalina tutkitun antigeenin sijaintipaikalla (Dako 2012b). Värjäys voidaan viimeistellä hematoksyliini-taustavärjäyksellä, jolla saadaan tumarajat paremmin näkyviin (Henriksen ym. 2009, 98). FISH-koettimien fluoresenssisignaalin muuntaminen kromogeenisiksi signaaleiksi on kuvattu alla (Kuva 7).



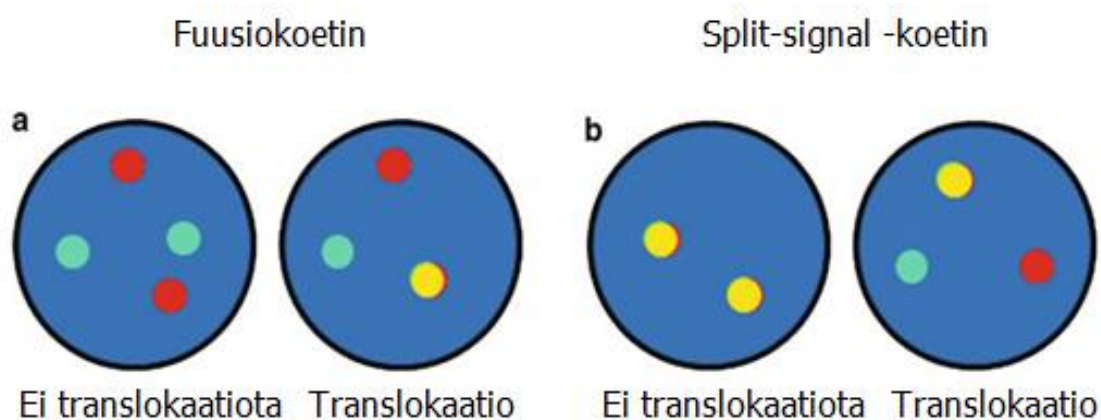
Kuva 7 Fluoresoivien signaalien muuntaminen kromogeenisiksi

Dako DuoCISH™-menetelmällä (mukaillen Henriksen ym. 2009, 98)

### 3.3.1 Translokaatiokoettimet

Translokaatiokoettimilla voidaan tutkia kromosomien rakenteellisia häiriöitä, jotka ovat yleensä seurausta kromosomin katkeamisesta ja osien uudelleenliittymisestä. Translokaatio tarkoittaa kromosomin osien vaihtoa, jossa kromosomin osat siirtyvät toiseen kromosomiin. (Lehto & Stenbäck 2012a.) Tietyt kromosomaaliset muutokset ja translokaatiot liittyvät tiettyihin syöpiin ja voivat aiheuttaa onkogeeneettistä aktivaatiota eri mekanismeilla (Macdonald ym. 2004, 173; van Rijk ym. 2010). Kun tiettyyn syöpään liittyvän geenimuutoksen emäsjärjestys tunnetaan, voidaan synteettisesti valmistaa koetin, jonka emäsjärjestys on komplementaarinen tunnetun geenijakson kanssa (Kiernan 2008, 229).

Eniten käytettyjä koettimia kliinisissä ja tutkimuslaboratorioissa ovat DNA-koettimet. DNA-koettimia on suhteellisen helppo valmistaa suuria määriä, joko synteettisesti tai kasvattamalla vektoreiden avulla. Lisäksi ne ovat parhaiten tunnettuja, sillä DNA-koettimien kinetiikka ja ominaisuudet ovat paremmin tiedossa kuin esimerkiksi RNA-koettimien. DNA-koettimia on helppo monistaa PCR-menetelmällä ja niiden pituutta voidaan muunnella laajasti. (Harvey & Schönau 2006, 89–90.) Translokaation havaitsemiseksi syöpäsoluissa voidaan käyttää split-signal (break-apart) -koettimia tai fuusiokoettimia (Kuva 8). Split-signal -koettimet sitoutuvat DNA:n tunnetun katkeamiskohdan molemmiin puolin ja ovat eri värisiä (van Rijk ym. 2010). Eri väriset pisteet nähdään yhdessä, kun genomissa ei ole tapahtunut muutosta. Jos geenialueella on tapahtunut translokaatio eli geenialueen siirtymä, nähdään eri väriset pisteet kauempana toisistaan. Fuusiokoettimissa puolestaan pisteet sijaitsevat erillään toisistaan, jos genomissa ei ole tapahtunut translokaatiota, ja yhdessä, jos tutkittava translokaatio on tapahtunut. (van Rijk ym. 2008.)

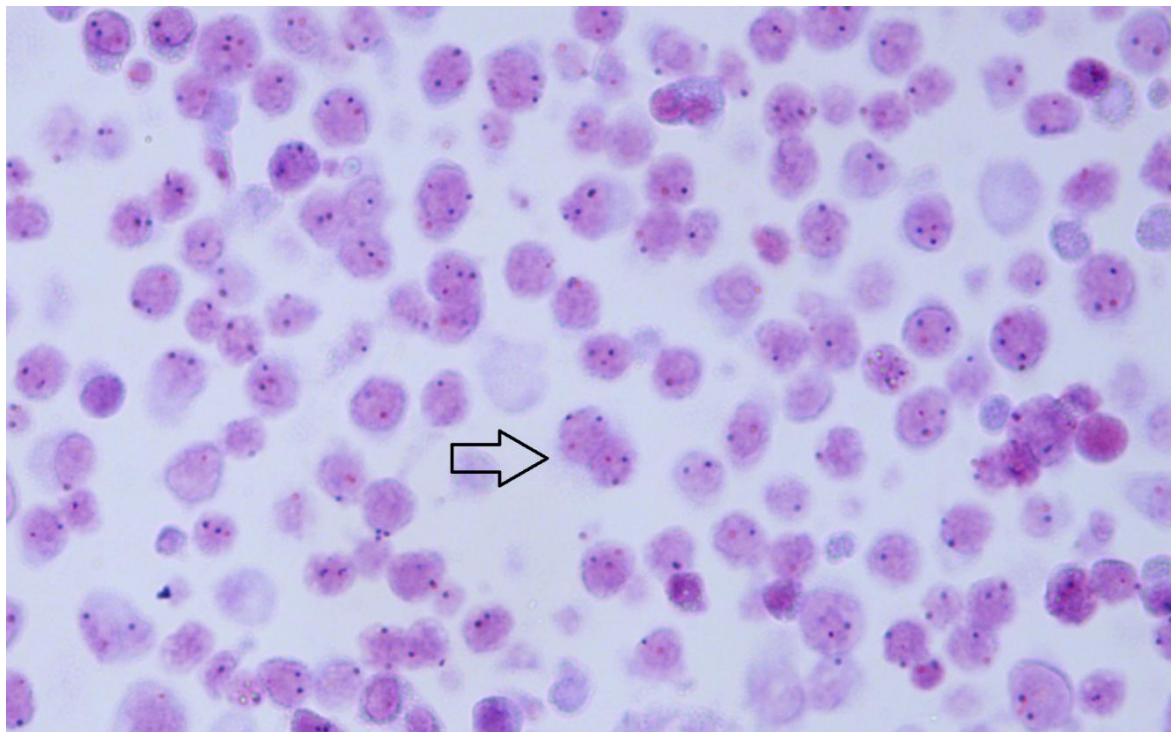


Kuva 8 Fuusiokoettimilla (a) translokaatio havaitaan, kun signaalit nähdään yhdessä (keltainen). Split-signal -koettimilla (b) signaalit ovat erillään, kun translokaatio on tapahtunut (vihreä ja punainen). (mukaillen van Rijk ym. 2008.)

Opinnäytetyötutkimuksessa käytettiin ALK1- ja BCL2-split-signal -translokaatiokoettimia. KISH-värjäyksessä käytetyllä ALK1-koettimella tunnistetaan anaplastisen lymfoomakinaasin geeni, joka sijaitsee kromosomin 2 raidassa p23. BCL2-koettimella puolestaan tunnistetaan kromosomin 18 raidassa q21 sijaitseva B-solu leukemia/lymfoma 2 -geeni. Molemmilla koettimilla punainen ja sininen signaali sijaitsevat tunnetun katkeamiskohdan molemmiin puolin. Translokaation tapahtuessa punai-



nen signaali siirtyy erilleen sinisestä signaalista. (Dako 2011a; Dako 2011b; Kuva 9.) Koettimien avulla nähtävät translokaatiot voidaan havaita geenialueen siirtymänä, mutta niillä ei voi havaita minne siirtymä on tapahtunut. Opinnäytetyössä käytetyt translokaatiokoettimet on kuvattu tarkemmin luvussa 7.5.

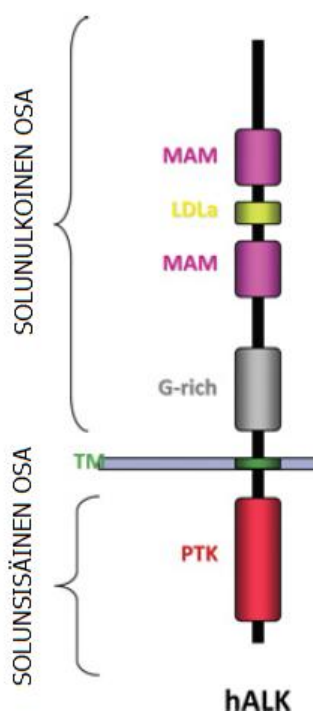


Kuva 9 Anaplastisen suurisolulymfooman näyte (ALCL 2), jossa translokaatioita (40x)

Kromosomien rakenteelliset poikkeavuudet merkitään kansainvälisen ISCN-standardin mukaan (international system for cytogenic nomenclature). Esimerkiksi suurisolulymfoomissa todettavan ALK-geenin ja NPM-geenin translokaatio kromosomien 2 ja 5 välillä merkitään  $t(2;5)(p23;q35)$ . Ensimmäisellä sulkumerkillä ilmoitetaan puolipisteellä erotettuna translokaation osallistuvat kromosomit ja toisissa suluissa kromosomien katkeamiskohdat. Merkintä  $t(2;5)(p23;q35)$  kertoo siis, että kromosomin 2 kohdassa p23 on katkos, joka on irronnut ja siirtynyt kromosomin 5 q35-katkeamiskohtaan. Tältä paikalta irronnut osa on vastavuoroisesti siirtynyt kromosomiin 2 katkeamiskohtaan p23. (Knuutila, 2012b.)

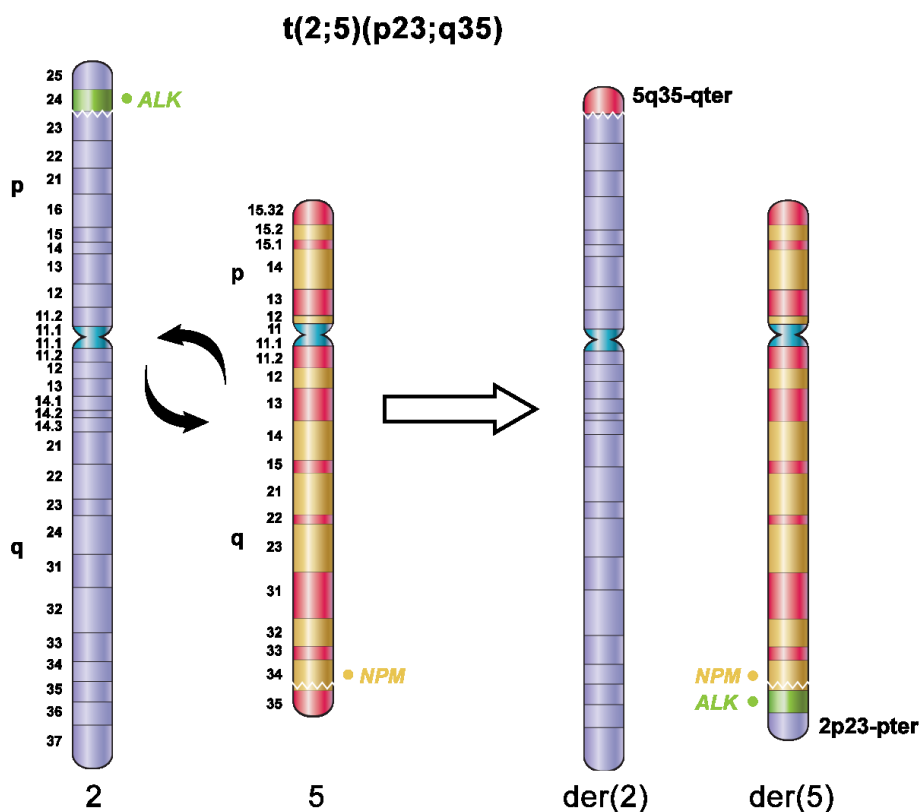
#### 4 ANAPLASTINEN LYMFoomAKINAASI

Anaplastinen lymfoomakinaasi (ALK) kuuluu reseptorityrosiinikinaaseihin (RTK), joilla on tärkeä rooli solujen biologisten toimintojen säätelyssä. ALK-geeni on normaalisti toiminnassa vain tietyissä hermoston solutyypeissä. (Rodig ym. 2009.) Geenin ilmentymiseen kuuluu useita biologisesti tärkeitä toimintoja, kuten solujen proliferaatio (määrän kasvu), differentaatio (erilaistuminen) ja apoptoosi. Näiden tekijöiden pohjalta geenin translokaatiot ja inversiot aiheuttavat onkogeneettisiä seurauksia. (Paik ym. 2011.)



Kuva 10 Anaplastinen lymfoomakinaasi (hALK = human ALK, PTK = proteiinityrososikinaasi) (mukaillen Palmer ym. 2009)

Ihmisen ALK-geeni sijaitsee kromosomin 2 raidassa p23 ja se koodaa proteiinia, joka koostuu neljästä osasta (solunulkoinen, solukalvon läpäisevä, solunsisäinen ja tyrosiinikinaasi) (Dako, 2011a; Kuva 10). ALK-geenin translokaatio tai inversio jonkun sen useista mahdollisista fuusiopareista kanssa johtaa ALK-proteiinin liikatuottoon. Tämä puolestaan johtaa proteiinin tyrosiinikinaasiosan yliaktiivisuuteen. (Thunnissen ym. 2012.) ALK havaittiin ensimmäisen kerran anaplastisen suurisolulymfooman yhteydessä, jossa sen fuusioituminen NPM-geenin kanssa aiheuttaa geenin muuttumisen onkogeeniksi (Kuva 11). Nykyään tunnetaan useita ALK-geenin yliaktiivisuuden johtavia muutoksia ja ne voidaan yhdistää tiettyyn syöpätyyppiin. Esimerkiksi EML4-ALK fuusiogeeni ei-pienisoluisessa keuhkokarsinoomassa aiheuttaa ALK-proteiinin ilmentymisen. (Palmer ym. 2009.)



Kuva 11 ALK-geenin translokaatio (2;5)(p23;q35), jossa ALK-geenialue siirtyy kromosomin kaksi p23-alueelta kromosomin viisi q35-alueelle (mukaillen Yang 2012)

Koska tyrosiinikinaasien rakennetta ja toimintaa solutasolla on tutkittu paljon, lääketeollisuudella on ollut hyvät lähtökohdat kehittää spesifisiä kinaasi-inhibiittoreita (Bang 2012; Hallberg & Palmer 2011). Erityisesti keuhkosyövän patogeneesiä ja molekyylibiologiaa on tutkittu viime vuosina ja sille on kehitetty uusia hoitoja (Lappi-Blanco, Mäkinen, Jartti, Mali & Kaarteenaho 2012). Tutkimuksien mukaan ALK-inhibiittorien käyttö estää solujen jakautumista ja edistää niiden apoptoosia. Tämän vuoksi on tärkeää pystyä selvittämään tarkasti potilaan ALK-translokaatiostatus, jotta tiedetään, voiko tämä hyötyä inhibiittorihoitosta. (Bang 2012; Hallberg & Palmer 2011.)

#### 4.1 Neuroblastooma

Neuroblastooma (Neuroblastoma, NBL) on yleisin lisämunuaisen ja sympaattisen hermoston kasvain, vaikkakin Suomessa todetaan vuosittain vain kymmenen tapausta. Se on pääosin varhaislapsuuden syöpä ja kaksi kolmasosaa tapauksista todetaan viiteen ikävuoteen mennessä. Kasvain löydetään yleensä vatsaontelosta, kaulasta tai rintakehän alueelta, mutta joskus sitä ei löydetä ollenkaan, jolloin diagnoosi tehdään etäpesäkkeistä. (National Cancer Institute 2012.)

ALK-geenimutaation merkitystä neuroblastooman synnyssä on selvitetty hiirimalleilla, jotka mukailivat taudin geneettistä rakennetta. Kaksi yleisintä neuroblastooman syntyyn vaikuttavaa ALK-mutaatiota ovat pistemutaatioita. Lisäksi kromosomin 17 monistuma on yksi ALK-proteiinin ilmentymiseen johtavista tekijöistä. ALK-geenilokuksen pistemutaatioita havaitaan lähes kaikissa suvuttain ilmentyvissä neuroblastoomissa ja noin 10 %:ssa satunnaisesti esiintyvissä. ALK-mutaatioiden tark-



kaa merkitystä tämän syöpätyypin synnyssä ei ole vielä pystytty kokonaisuudessaan määrittämään. (Heukamp ym. 2012.)

#### 4.2 Ei-pienisolainen keuhkokarsinoma

Epiteelikudoksen keuhkosityövät jaetaan kahteen eri ryhmään: pienisolaiseen karsinomaan ja ei-pienisoluisiin karsinomiin (Non-small cell lung carcinoma, NSCLC). Ei-pienisolaiset karsinomat jaetaan vielä kolmeen päätyyppiin, jotka ovat levyepiteelikarsinoma, adenokarsinoma ja suurisolainen karsinoma. Levyepiteelikarsinoma käsittää 40 % kaikista diagnosoiduista keuhkosityöpätapauksista ja on yleisimmin tupakoinnin aiheuttama. Adenokarsinomien osuus kaikista keuhkosityöistä on noin 25 % ja se on naisten yleisin keuhkosityöpä. Se liitetään usein tupakointiin, mutta lähes poikkeuksetta tupakoimattomien keuhkosityöpäpotilaiden syöpä on adenokarsinoma. Suurisolainen karsinoma on ei-pienisolaisen keuhkokarsinoman huonosti erilaistunut muoto. Se on näistä muodoista harvinaisin käsittäen vain 4 % kaikista keuhkosityöistä. (Mali, Ojala & Salo 2007, 279–280.)

Yleisin ja eniten tutkittu ei-pienisolaisen keuhkokarsinoman syntyyn johtava tekijä on kromosomin 2 lyhyessä käsivarressa tapahtuva inversio, joka johtaa ALK-geenin fuusioitumiseen EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) -geenin kanssa. Syntyvässä fuusioproteiinissa on ALK:n solunsisäinen tyrosiinikinaasiosa (Kuva 10) ja osia EML4-proteiinin solunulkoisista rakenteista. Näiden muutosten johdosta kinaasi ei vaadi aktivoitumiseensa solunulkoisia signaaleja vaan pystyy aktivoitumaan itsestään, mikä pidentää solun elinaikaa ja johtaa sen rakenteen muutoksiin sekä hallitsemattomaan solunjakautumiseen. (McLeer-Florin ym. 2012.) EML4-ALK-mutaatioita esiintyy 3–8 %:ssa keuhkosityöpäkasvaimista ja tähän uudelleenjärjestymään on viime vuosina kehitetty kohdennettuja suun kautta otettavia lääkkeitä (gefitinibi, erlotinibi ja krittotinibi). Uusien lääkkeiden myötä on tärkeää tunnistaa hoidosta hyötyvät potilaat ja ne, joille niistä voi olla jopa haittaa. (Knuutila & Salmenkivi 2012; Lappi-Blanco ym. 2012.)

#### 4.3 Anaplastinen suurisolulymfooma

ALK-geeni koodaa tyrosiinikinaasireseptoria, joka on normaaleissa imukudossoluissa vaimennettu (Delsol, Ralfkiaer, Stein, Wright & Jaffe 2001, 230–235; Paik ym. 2011). Anaplastinen suurisolulymfooma (Anaplastic large cell lymphoma, ALCL) on T-lymfosyyttien lymfooma ja se koostuu yleensä suurista lymfosyyteistä, joissa on paljon sytoplasmaa ja usein muodoltaan munuaista muistuttava tuma. Suurin osa anaplastisista suurisolulymfoomista on positiivisia ALK-proteiinin suhteen, mutta myös ALK-negatiivisia syöpiä löytyy. ALK-positiiviset anaplastiset suurisolulymfoomat ilmenevät useimmiten ensimmäisen kolmenkymmenen elinvuoden aikana ja ovat yleisempi miehillä kuin naisilla. ALK-positiivinen syöpätyyppi löytyy yleensä imusolmukkeesta, mutta sitä voi olla myös ihossa, luussa, pehmytkudoksissa, keuhkoissa ja maksassa. ALK-proteiinin tuottoa ilmenee noin 60–85 %:ssa syöpätapauksista ja värjäytyvyyttä voi ilmetä syöpäsolujen sytoplasmassa ja tumassa. (Delsol ym. 2001, 230; Teerenhovi, Franssila, Lehtinen & Jyrkkiö 2007, 636.) ALK-proteiinin tuotto syöpäsoluissa on tärkeä ennustava tekijä potilaan taudinkuvan kannalta, sillä ALK-positiivisten potilaiden

viiden vuoden ennuste on huomattavasti parempi kuin ALK-negatiivisten (Palmer, Vernersson, Grabbe & Hallberg 2009, 349).

Muutokset ALK-tyrosiinikinaasireseptorissa johtuvat ALK-lokuksen geenimuutoksesta kromosomissa 2. Geenisiirtymä voi tapahtua useaan kromosomiin, mutta yleisin muutos on ALK-geenin translokatio  $t(2;5)(p23;q35)$ , jossa geeni siirtyy kromosomista 2 kromosomiin 5. Anaplastisessa suurisolulymfomassa geeni siirtyy kromosomiin 5, jossa se fuusioituu normaaleja solun toimintoja ylläpitävän geenin kanssa (NPM-geeni). (Delsol ym. 2001, 230–235; Paik ym. 2011; Kuva 11.) Geenimuutoksen seurauksena fuusioproteiini mahdollistaa ALK-tyrosiinikinaasireseptorin aktivoitumisen ilman solunulkoisia signaaleja. Tämä johtaa tyrosiinikinaasin yliaktiivisuuteen, joka aiheuttaa kiihtyneen solunjakautumisen, erilaistumisen ja estää apoptoosia. (Palmer ym. 2009.)

## 5 B-SOLU LYMFOOMA 2

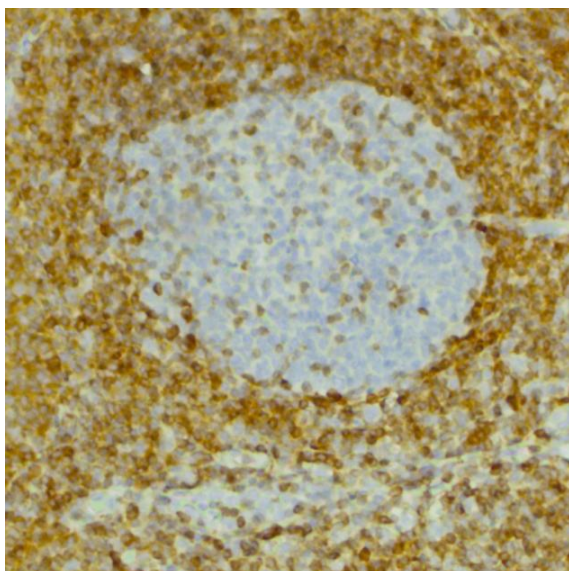
Ihmisen B-solu lymfooma 2 (BCL2) -proteiinin tuottoa säätelevä geeni sijaitsee kromosomin 18 raidassa q21 (Dako 2011b). BCL2-proteiinia ilmenee normaalisti esimerkiksi esiasteen hematopoieettisissa soluissa sekä pitkäikäisissä soluissa, kuten T-lymfosyyteissä ja follikkelien manttelialueen B-lymfosyyteissä. Imusolmukkeen kuorikerroksessa on imukeräsiä, joiden keskusta koostuu soluista, joissa ei havaita BCL2-proteiinin tuottoa. (Macdonald ym. 2004, 177; Kuva 12; Kuva 13.) BCL2-proteiini on muiden sytoplasmassa sijaitsevien samaan joukkoon kuuluvien proteiinien lisäksi yksi apoptoosia eli ohjattua solukuolemaa pääasiallisesti säätelevistä tekijöistä (Macdonald ym. 2004, 177). BCL2-proteiini sitoutuu mitokondrioiden ulkokalvolle ja estää niitä päästämästä solulimaan säätelytekijöitä, jotka aktivoivat solukalvoja hajottavia entsyymiketjuja. Reaktioketju estää normaalin apoptoosin eli solukuoleman käynnistymisen. (Dewson & Kluck 2012, 9.)

Havainnot BCL2-proteiinin solukuolemaa estävistä ominaisuuksista ovat kasvattaneet tarvetta syöpähoidoille, jotka kohdistuvat juuri apoptoosia estäviin proteiineihin. Osa syöpähoidoista käynnistää solunsisäisen mitokondrion avulla tapahtuvan apoptoosin. Viime aikoina on kehitetty useita lääkkeitä juuri BCL2-positiivisiin syöpätyyppeihin, mikä on parantanut näiden huonosti perinteisiin hoitoihin reagoivien syöpien ennustetta. (Weyhenmeyer, Murphy, Prehn & Murphy 2012, 192–193.) Joissakin tutkimuksissa on havaittu translokaatioiden hävinnän hoidon myötä, mutta lähes kaikissa tapauksissa tauti uusiutui muutamien syöpäsolujen selviytyttyä (Georgescu ym. 2010, 687).

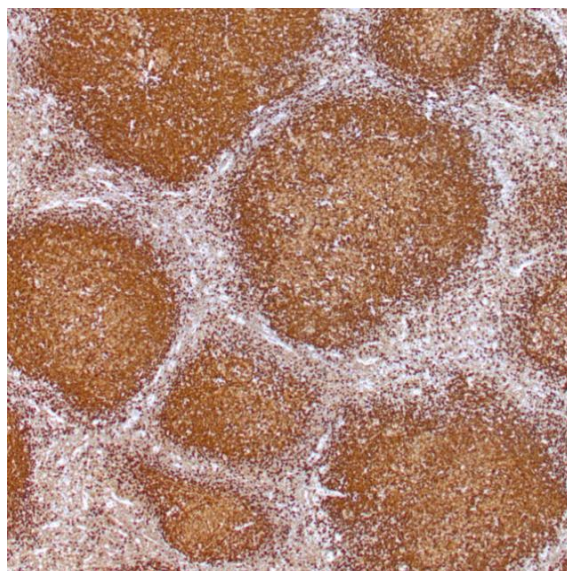
### 5.1 Follikulaarinen lymfooma

Follikulaarinen lymfooma (Follicular lymphoma, FL) on pääosin aikuisten tauti ja sitä ilmenee harvoin alle 20-vuotiailla. Sairastuvien keski-ikä on 59 vuotta ja tauti on hieman yleisempi naisilla kuin ja miehillä. Tauti on yleensä paikallistunut pään ja kaulan alueen imusolmukkeisiin sekä nielurisoihin. Imusolmukkeiden lisäksi kasvaimia voi myös löytyä haimasta, luuytimeä sekä perifeerisestä verestä, mutta tapaukset ovat harvinaisempia. (Nathwani ym. 2001, 162.)

Follikulaarinen lymfooma on imusolmukkeen follikkelin keskustan B-lymfosyyttien neoplasma. Neoplasma tarkoittaa epätyypillistä solukasvua, joka kasvaa hallitsemattomasti, mutta jolla ei ole merkitystä elimistön toiminnan kannalta. (Carton ym. 2007, 51, 364.) Terveen imusolmukkeen follikkelit ovat pyöreitä tarkkarajaisia solurakenteita, joiden keskellä on itukeskus, jota ympäröi pienistä lymfosyyteistä koostuva seinämä eli manttelisoluvyöhyke (Solunetti, 2006; Kuva 12). Follikulaarisessa lymfoomassa follikkelit eivät ole tarkkarajaisia, vaan niistä puuttuu terveen follikkelin manttelisoluvyöhyke ja ne ovat hyvin tiiviitä. Kasvaimet ovat hyvin usein positiivisia BCL2-proteiinin ilmentymisen suhteen, mikä voi aiheuttaa normaalin solukuoleman estymisen (Nathwani ym. 2001, 162–165; Teerenhovi ym. 2007, 623; Kuva 13). Follikulaarisista lymfoomista vajaa kolmannes muuttuu aggressiivisemmaksi suurten B-solujen lymfoomaksi (Carton, 2007, 364; Teerenhovi ym. 2007, 623).



Kuva 12 Normaali imusolmukkeen follikkeli, jossa ei havaita BCL2-proteiinin tuottoa (20x)



Kuva 13 Follikulaarisessa lymfoomassa (FL 1) havaittava BCL2-proteiinin tuotto (2,5x)

BCL2-esisyöpägeenin aktivoitumisen aiheuttaa kromosomitranslokaation  $t(14;18)(q32;q21)$ , jota esiintyy lähes kaikissa follikulaarisen lymfooman tapauksista. BCL2-geenin translokaatiossa BCL2-geeni siirtyy tietyn immunoglobuliinin raskasketjua koodaavan geenin tehostajajaksolle, mikä johtaa BCL2-proteiinin säätelemättömään tuottoon. (Galteland ym. 2005.) Translokaation seurauksena solukuolema estyy ja kudoksiin alkaa kertyä normaalia pitkäikäisempiä soluja (Nathwani ym. 2001, 162–165; Teerenhovi ym. 2007, 623).

## 6 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tämä opinnäytetyötutkimus liittyy analyysimenetelmän käyttöönottoon patologian laboratoriossa. Opinnäytetyön tarkoituksena on suorittaa kromogeeninen in situ hybridisaatio (KISH) -menetelmän alustava sisäänajo (optimointi) ja tutkia translokaatiokoettimien ALK1 ja BCL2 toimivuutta formaliinifiksoiduilla parafiinileikkeillä. Opinnäytetyön tavoitteena on arvioida KISH-menetelmän hyödynnettävyys KYSin patologian syöpädiagnostiikassa selvittämällä kuinka translokaatiokoettimet saadaan toimimaan käytetyllä näytemateriaalilla ja arvioimalla KISH-menetelmän vastaavuus rutiinikäytössä oleviin immunohistokemiallisiin (IHK) menetelmiin. Vastaavuuden selvittämiseksi KISH-näytteistä etsitään translokaatioita (geenimuutosta) IHK-näytteissä ALK- tai BCL2-proteiinia ilmentäviltä alueilta eli tutkittiin aiheutuuko ALK- tai BCL2-proteiinin tuotto kromosomaalisesta translokaatiosta. ALK1-koettimella tunnistetaan anaplastisen lymfoomakinaasin geeni, joka sijaitsee kromosomissa 2 (p23). BCL2-koettimella puolestaan tunnistetaan kromosomissa 18 (q21) sijaitseva B-solu leukemia/lymfooma 2 -geeni. (Dako 2011a; Dako 2011b.) ALK1-koettimien toimivuutta tutkitaan neuroblastooman, ei-pienisoluisen keuhkokarsinoman ja anaplastisen suurisolulymfooman näytteillä. BCL2-koettimen toimivuutta tutkitaan follikulaarisen lymfooman näytteillä.

Translokaatiokoettimet eivät ole aiemmin olleet diagnostisessa käytössä Kuopion yliopistollisen sairaalan kliinisen patologian yksikössä, joten opinnäytetyön tutkimus liittyy menetelmän käyttöönottoon. Tuotoksena opinnäytetyöstä saadaan tutkimustietoa, jota voidaan käyttää KYSin patologiassa uuden diagnostisen menetelmän käyttöönotossa. Opinnäytetyötutkimus edesauttaa patologian yksikköä laajentamaan tutkimusvalikoimaansa ja tarkentamaan syöpädiagnostiikkaansa. Menetelmän alustavasta sisäänajosta saatuja tuloksia voidaan hyödyntää testauksen myöhemmissä vaiheissa. Tutkimuksessa selvitetään kromogeenisen in situ hybridisaation optimointitarve tavanomaisesti otetuille ja formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille.

Opinnäytetyön tutkimuskysymyksiä ovat:

1. Miten translokaatiokoettimet toimivat diagnostiikassa käytettäville formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille?
2. Onko kromogeenisen in situ hybridisaation tulos yhtenevä immunohistokemiallisen värjäyksen tuloksen kanssa?
3. Onko kromogeeninen in situ hybridisaatio käyttökelpoinen vaihtoehtomenetelmä immunohistokemian värjäykselle tutkittujen syöpien diagnostiikassa?

## 7 TUTKIMUKSEN KULKU

Opinnäytetyön aihe ”ALK1- JA BCL2-translokaatiokoettimien toimivuus diagnostisissa näytteissä” saatiin Kuopion yliopistollisen sairaalan kuvantamiskeskuksen klinisen patologian yksiköltä syksyllä 2012. Varsinainen opinnäytetyöprosessi aloitettiin keväällä 2013. Kevään aikana kirjoitettiin aihekuvaus ja tutkimussuunnitelma sekä hankittiin opinnäytetyöhön tarvittava tutkimuslupa (LIITE 13) ja ohjaussopimukset sekä suoritettiin tiedonhakua ja perehdyttiin aiempiin tutkimuksiin. Tutkimuslupa työlle myönnettiin 19.1.2013. Maalis- ja huhtikuun aikana suoritettiin opinnäytetyön työvaihe, josta laadittu yhteenveto esitettiin opinnäytetyön toimeksiantajille työvaiheen valmistuttua huhtikuussa 2013. Opinnäytetyöraportin kirjoittaminen aloitettiin toukokuussa.

Opinnäytetyön laboratoriotyövaihe jakautui tutkimuksen valmisteluun, IHK-värjäykseen, KISH-menetelmän optimointiin sekä näytteitten analysointiin ja tulosten arviointiin. Tutkimuksen valmisteluvaiheeseen kuului laboratoriotilojen ja laitteiston valmistelu, näytemateriaalin hankkiminen sekä näytteitten leikkaaminen ja kiinnittäminen objektilaseille tutkimusta varten. Opinnäytetyön toimeksiantaja hankki tutkimuksessa tarvittavat reagenssit sekä tarjosi tutkimuskäyttöön näytteet, tilat ja laitteet. Tutkimusvaiheessa suoritettiin IHK- ja KISH-värjäykset tarvittavine muutoksineen. Opinnäytetyön tekijät suorittivat laboratoriotyöt itsenäisesti ohjaajien opastuksella. Laboratoriotyövaiheen aikana toimittiin yhteistyössä KYSin klinisen patologian laboratorion henkilökunnan kanssa. Näytteitten analysointivaiheessa värjätyt lasit valokuvattiin, minkä jälkeen kuvatuista näytteistä laskettuja tuloksia tarkasteltiin yhdessä opinnäytetyön ohjaajien kanssa.

### 7.1 Tutkimusmenetelmät

Opinnäytetyön tutkimusote on osittain kvalitatiivinen ja osittain kvantitatiivinen. Hirsjärven, Remeksen ja Sajavaaran (2009, 136) mukaan kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen suuntaus voivat täydentää tutkimuksessa toisiaan. Menetelmiä voidaan käyttää rinnakkain, jos yksinkertaisten laskennallisten tekniikoiden avulla halutaan helpottaa kvalitatiivisen tutkimuksen tarkastelua. Opinnäytetyötutkimus on toisaalta kartoittava tutkimus, jossa ”katsotaan mitä tapahtuu” ja toisaalta selittävä tutkimus, jossa etsitään selitystä jollekin tilanteelle ja tunnistetaan syy- ja seuraussuhteita. Molemmissa tapauksissa tutkimusstrategioiksi sopivat sekä kvalitatiivinen että kvantitatiivinen. (Hirsjärvi ym. 2009, 136–138.) Tutkimuksessa kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen menetelmä täydentävät toisiaan ja niitä käytetään tutkimuksessa rinnakkain.

Opinnäytetyössä käytetään tutkimusongelmasta riippuen erilaista tutkimusotetta. Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, kuinka KISH-menetelmä saadaan toimimaan käytettäville syöpätyypeille ja voidaanko KISH-menetelmää käyttää vaihtoehtomenetelmänä IHK-värjäykselle. Näiden tutkimusongelmien valossa tutkimusstrategia on kvalitatiivinen eli laadullinen. Tutkimuksessa selvitetään myös KISH- ja IHK-menetelmien vastaavuus toisiinsa, missä hyödynnetään havaintoaineiston tulosten esittämistä prosenttilukuina (translokaatiopositiivisten solujen suhde laskettuihin soluihin). Tässä tutkimusvaiheessa käytetään kvantitatiivista lähestymistapaa. (Hirsjärvi ym. 2009, 137.)

Opinnäytetyö liittyy ennen kaikkea menetelmän testaukseen. Opinnäytetyötutkimuksesta saatua tietoa voidaan hyödyntää myöhemmin KISH-menetelmän käyttöönotossa KYSin klinisen patologian yksikössä. International Academy of Pathology (IAP) velvoittaa, että uusi menetelmä tulee ennen käyttöönottoa validoida eli kelpuuttaa. Validointi voidaan toteuttaa tutkimuksella, jolla saavutetaan objektiivisen todistusaineiston perusteella varmistus siitä, että menetelmään liittyvät erityisvaatimukset täyttyvät ja menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa. Validointi tulee tehdä kaikista uusista värjäysmenetelmistä tai kun vanhoihin menetelmiin tehdään oleellisia muutoksia. Menetelmä voidaan ottaa käyttöön vasta, kun se on asianmukaisesti testattu ja hyväksytty. (IAP 2012.)

## 7.2 Tiedonhaku

Tiedonhaku opinnäytetyön tutkimussuunnitelmaa ja raporttia varten aloitettiin Savonia-ammattikorkeakoulun informaation ohjauksella tammikuussa 2013. Tiedonhakua suoritettiin Medic-, PubMed-, CINAHL- ja Cochrane-tietokannoista. Suurin osa artikkeleista löytyi PubMed-tietokannan kautta. Artikkelihauksessa käytettiin apuna myös tutkimuksessa käytettyjen artikkeleiden lähdeluetteloita. Hakutermit olivat englanninkielisiä, koska varhaisessa vaiheessa huomattiin, etteivät suomenkieliset haut tuota tulosta. Käytettyjä hakutermejä olivat esimerkiksi: immunohistochemistry, IHC, chromogenic in situ hybridisation, CISH, fluorescence in situ hybridisation, FISH, comparison, pathology, method, translocation, non-small cell lung carcinoma, follicular lymphoma, anaplastic large cell lymphoma, neuroblastoma, tumor markers, carcinoma in situ, gene expression profiling, BCL2, ALK1.

Lähdekirjallisuutta haettiin Savonia-ammattikorkeakoulun kirjastosta ja KYSin tieteellisestä kirjastosta. Käytetty lähdeaineisto koostuu suurimmaksi osaksi 2000-luvulla julkaistuista ulkomaalaisista tieteellisistä artikkeleista ja KYSin tieteellisen kirjaston kirjoista. Lähteeksi sopivaa suomalaista materiaalia ei, muutamaa kirjaa lukuun ottamatta, ollut käytettävissä. Kaksi tärkeintä suomenkielistä lähdetä olivat Duodecimin kirjat Patologia 2012 (toim. Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F.) ja Syöpätaudit 2007 (toim. Joensuu, H., Roberts, P., Teppo, L. & Tenhunen, M.). Lähteenä käytettiin myös laite- ja reagenssivalmistaja Dakon julkaisemia menetelmäohjeita ja muita julkaisuja. Aihekuvausten teko ja tutkimussuunnitelmaa varten tehty kirjallisuuskatsaus sekä aiempiin tutkimuksiin perehtyminen rakensivat teoriapohjan opinnäytetyölle ja antoivat viitteitä mahdollisista tuloksista.

## 7.3 Aiemmat tutkimukset

Tässä kappaleessa kuvataan opinnäytetyötutkimukseen liittyviä aiempia tutkimuksia. Kuvatut tutkimukset osoittavat KISH-menetelmän vastaavuuden jo kymmeniä vuosia syöpädiagnostiikassa käytettyyn FISH-menetelmään sekä näiden kahden menetelmän vastaavuuden IHC-menetelmään. KISH-menetelmän vertaaminen FISH-menetelmään kertoo KISH-värjäyksen potentiaalista syöpädiagnostisena välineenä. KISH- ja IHC- sekä KISH- ja FISH-menetelmiä on verrattu rintasyöpänaytteitten tutkimuksissa, mutta myös tähän opinnäytetyöhön liittyen lymfoomanäytteillä ja ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman näytteillä. Näytemateriaalina on käytetty parafiinileikkeitä, kuten

tässäkin tutkimuksessa. Tässä opinnäytetyössä käytetyn dual-color-CISH-menetelmän toimivuutta on tutkittu vuonna 2012 invasiivisen rintasyövän näytteillä ja selvitetty tulosten vastaavuutta IHK-menetelmällä saavutettuihin tuloksiin. Opinnäytetyössä käytettyä DuoCISH™-menetelmäkittiä on tutkittu vuonna 2010 tehdyssä tutkimuksessa, jossa selvitettiin kuinka hyvin menetelmä muuntaa fluoresoivat FISH-signaalit kromogeenisiksi KISH-signaaleiksi.

Vuonna 2009 tehdyssä tutkimuksessa on verrattu ensimmäistä kertaa dual-color-CISH-menetelmää IHK- ja FISH-menetelmiin HER2/neu-geenimonistuman osoittamiseksi suurella näytemäärällä. Tutkimuksessa analysoitiin 205 parafiiniin valettua rintasyöpänäytettä. KISH-värjäyksessä käytettiin ZytoVision® dual-color-CISH-menetelmäkittiä, jonka työvaiheet poikkeavat hieman tässä opinnäytetyötutkimuksessa käytetystä Dakon DuoCISH™-menetelmäkittistä. Tutkimuksessa IHK-näytteet jaettiin yhteen negatiivisten ryhmään ja kolmeen positiivisten (1 +, 2 +, 3 +) ryhmään. Kaikista 205 värjäystä näytteestä negatiivisia oli 8,3 %, 1 + värjäytyneitä 10,2 %, 2 + värjäytyneitä 53,7 % ja 3+ värjäytyneitä 27,8 %. KISH-värjäyistä 205 tutkimusnäytteestä analysoitiin vain 202 (98.5 %). FISH-menetelmällä värjättiin yhteensä 129 näytettä. FISH-menetelmän tuloksista 91,5 % vastasi IHK-menetelmällä saatuja tuloksia. Näytteistä 8,5 % antoi päinvastaisen tuloksen. **KISH-menetelmän tuloksista 94,1% vastasi IHK-menetelmän tuloksia** ja näytteistä 5,9 % antoi päinvastaisen tuloksen. FISH ja KISH vastasivat toisiaan 94,6 %:sesti. **FISH- ja KISH-menetelmien voitiin todeta vastaavan IHK-menetelmän tuloksia erittäin hyvin** HER2/neu geenimonistuman tutkimisessa. KISH antoi IHK-tulosta vastaavia tuloksia hieman FISH-menetelmää enemmän. (Mayr ym. 2009.)

Vuonna 2010 tehdyn tutkimuksen tarkoituksena oli demonstroida Dakon DuoCISH™-menetelmän toimivuus neljällä FISH-koettimella (c-MYC, EGRF, HER2, TOP2A). DuoCISH-reagensseilla muunnetaan FISH-koettimien fluoresoivat Texas Red- ja FITC-signaalit kromogeenisiksi signaaleiksi (Luku 3.3). Tutkimuksessa kaikista koettimista tehtiin "dot-to-dot"-vertailu, jossa FISH-menetelmällä värjättyt lasit pestiin ja värjättiin uudelleen KISH-menetelmällä. Tämä mahdollisti tarkalleen samojen solujen tarkastelun kummankin menetelmän kohdalla. Kaikkien neljän koettimen kohdalla signaalien vastaavuus oli lähes identtinen. Tutkimuksessa verrattiin myös erikseen HER2- ja TOP2A-koettimia. Näiden kahden koettimen kohdalla FISH- ja KISH-värjäykset tehtiin omille laseilleen. **Menetelmien vastaavuus molemmille koettimille oli 100 %. Tällä tutkimuksella osoitettiin, että Dakon DuoCISH™ muuntaa fluoresenssisignaalit kromogeenisiksi signaaleiksi erinomaisesti.** (Hoff ym. 2010.)

**Vuonna 2010 tehty tutkimus osoittaa, että KISH-menetelmä kannattaa vakioida lymfoomadiagnostiikassa. Sen todetaan olevan yhtä luotettava menetelmä kuin FISH,** jota on käytetty syöpädiagnostiikassa jo muutamia vuosikymmeniä. Tutkimuksessa käytettiin 540 näytettä, jotka koostuivat 11 eri lymfoomatyyppistä ja hyvälaatuisista, reaktiivisista lymfoomakudosnäytteistä. Näytteet värjättiin käyttäen KISH-menetelmää ja saatua tulosta verrattiin aiemmin tehtyyn FISH-värjäykseen. KISH-menetelmällä värjäyistä näytteistä vain selvät signaalit otettiin huomioon, joten analysoituja näytteitä oli lopulta 310. Näistä näytteistä vain kahdeksasta (2,58 %) saatiin eri tulokset KISH- ja FISH-menetelmillä. (van Rijk ym. 2010.)



Vuonna 2011 tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin IHK-menetelmän vastaavuutta FISH- ja KISH-menetelmiin ALK-geenimuutoksen havaitsemiseksi ei-pienisoluisessa keuhkokarsinoomassa. Tutkimusmateriaali koostui 465 formaliinifiksoidusta ja parafiiniin valetusta näytteestä. FISH- ja KISH- menetelmässä käytettiin dual-color-break-apart-ALK-koettimia. Syöpänäytteitten IHK-tulokset jaettiin värjäyksen intensiteettiin ja sytoplasmisesta värjäytyneiden syöpäsolujen prosentuaaliseen osuuteen perustuen neljään ryhmään (0 = ei värjäytymistä, 1, 2, 3 = runsas värjäytyvyys). Kaikista näytteistä FISH-menetelmällä tutkittiin 453 (97,4 %) näytettä ja KISH-menetelmällä 449 (96,6 %) näytettä. Analysoimattomien näytteitten signaalit olivat liian heikkoja geenimuutokseen määrittämiseksi. **KISH-menetelmällä analysoiduista näytteistä löytyi ALK-geenimuutos 4 %:sta ja FISH-menetelmällä 4,2 %:sta, joten FISH- ja KISH- menetelmien vastaavuus oli erinomainen.** ALK-proteiinin tuotto havaittiin 8,6 %:sta IHK-näytteistä. Kaikki KISH-positiiviset syöpänäytteet oli arvioitu IHK-värjäyksissä ryhmään 3 tai 2 ja kaikki KISH-negatiiviset ryhmään 1 tai 0 kuuluviksi. Kun IHK-tulokset 3 ja 2 luettiin positiivisiksi ja 1 ja 0 negatiivisiksi, tulosten vastaavuus KISH-tulosten suhteen oli erinomainen. **Tulokset osoittavat, että ALK-geenistatus ja ALK-proteiinin ilmentyminen vastaavat toisiaan KISH- ja IHK-menetelmissä.** (Kim ym. 2011.)

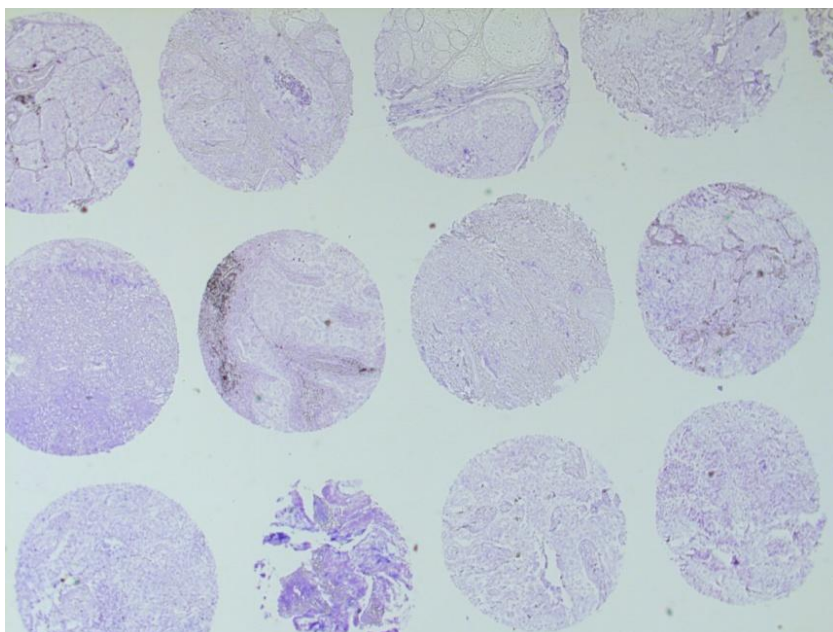
#### 7.4 Näyttemateriaali

Opinnäytetyötutkimuksen tutkimusnäytteet etsittiin näyteblokkivarastoista opinnäytetyön ohjaajien tekemän alkuselvityksen perusteella. Näytteet oli valittu siten, että ne olisivat suurella todennäköisyydellä IHK-värjäyksessä ALK- tai BCL2-positiivisia. Näyteblokkeja valittiin yhteensä 17, joista kuusi oli neuroblastooman, kaksi ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman, kolme anaplastisen suurisolulymfooman ja kuusi follikulaarisen lymfooman näyteblokkeja. Alla on taulukoituna tutkimusnäytteet, näytekoodit ja näytteen vuosi (Taulukko 1). Näytekoodi kertoo näytteen syöpätyypin (NBL/NSCLC/ALCL/FL/MB) ja näytenumeron. Saman näytteen eri näyteblokit on erotettu aakkosilla.

Taulukko 1 Tutkimusnäytteet syöpätyypeittäin

Neuroblastooma	Ei-pienisolainen keuhkokarsinooma	Anaplastinen suurisolulymfooma	Follikulaarinen lymfooma
NBL 1 2008	NSCLC 1 2010	ALCL 1A 2009	FL 1 2012
NBL 2A 2007	NSCLC 2 2010	ALCL 1B 2009	FL2 2012
NBL 2B 2007		ALCL 2 2009	FL3 2013
NBL 3A 2006	Monikudosblokki MB 1		FL 4 2013
NBL 3B 2006	Monikudosblokki MB 2		FL 5 2012
NBL 3C 2006	Monikudosblokki MB 3		FL 6 2013

Tutkimuksessa käytettiin kolmea keuhkonäytteitten monikudosblokkia (MB 1, MB 2, MB 3), joilla lisättiin ei-pienisoluisen keuhkokarsinoomanäytteitten määrää. Tutkimuksessa käytetyt monikudosblokit koostuivat erilaisista keuhkonäytteistä (Kuva 14). Yhteensä niissä oli 216 näytettä: MB 1-näytteessä 87, MB 2-näytteessä 64 ja MB 3-näytteessä 65 kappaletta.



Kuva 14 Keuhkonäytteitten monikudosblokki (2,5x)

## 7.5 Laitteet ja reagenssit

IHK-värjäykset BCL2-näytteille (follikulaarinen lymfooma) tehtiin Roche Ventanan BenchMark XT automated IHC/ISH Slide Staining System -automaatilla. Laitteen valmistuttaja on Ventana Medical Systems, Inc. (Tuscon, Arizona, USA). ALK-näytteitten (neuroblastooma, ei-pienisolainen keuhkokarsinoma, anaplastinen suurisolulymfooma) IHC-värjäyksissä ja KISH-värjäysten automaattityövaiheessa käytettiin Dako Autostainer Link 48 -automaattia. ALK-IHK-näytteitten esikäsittelyssä käytettiin Dako Pt Link Pre-Treatment module for tissue specimen -esikäsittelylaitetta. Laitteitten valmistuttaja on Dako Denmark A/S (Glostrup, Tanska).

Objektilasit: Thermo Scientific SuperFrost +

Peitinlasien koot: 20 mm x 20 mm tai 24 mm x 40 mm

KISH-näytelasien päällystysaine: Aquatex, BDH, VWR international

IHK-värjäyksissä käytettäviä vasta-aineita olivat Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody p80 (Anaplastic Lymphoma Kinase) ja Anti-BCL-2 (SP66) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (LIITE 1; LIITE 2). ALK-vasta-aine on suunniteltu tunnistamaan kolmanneksessa suurisolulymfoomista todetun ALK-geenin ja NPM-geenin fuusioitumisen seurauksena syntyvän t(2;5)(p23;q35) translokaation ja sen seurauksena kiihtyneen ALK-onkoproteiinin tuotannon (Novocastra™ 2008). Tässä työssä vasta-ainetta käytettiin myös ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman ja neuroblastooman näytteille, joissa molemmissa tutkitaan ALK-geeniin kohdistuneesta translokaatiosta aiheutunutta ALK-proteiinin tuottoa. Anti-BCL-2 -vasta-aine on kehitetty BCL2-onkoproteiinia vastaan (Ventana 2011). Tässä työssä sitä käytettiin follikulaarisen lymfooman näytteille.

IHK- ja KISH-värjäyksien eri työvaiheissa käytetyt reagenssit on esitetty seuraavissa taulukoissa (Taulukko 2; Taulukko 3).

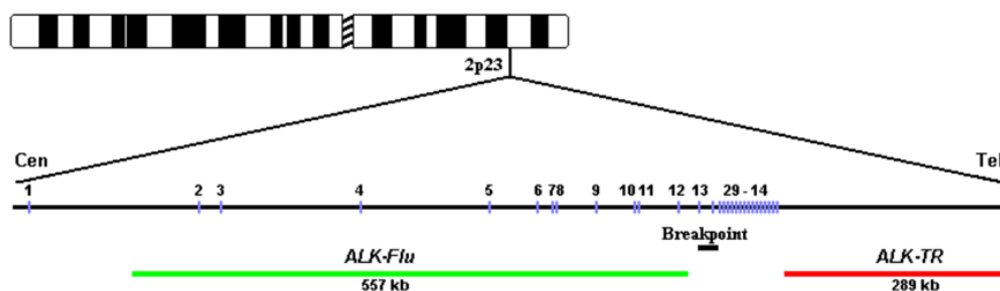
Taulukko 2 IHK-värjäysten työvaiheet ja reagenssit

Työvaihe	Autostainer-reagenssit	Ventana-regenssit
Parafiinin poisto ja esikäsittely	Dako Pt Link 3in1 TRIS/EDTA pH 9 tai sitraatti pH 6	Ez Prep Solution Cell Conditioning 1
Peroksidaasin poisto	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	UV INHIBITOR
Primaarivasta-aine	ALK Novocastra (klooni 5A4)	Anti-BCL-2 (klooni SP66)
Linkkeri	EnVision FLEX + Mouse (LINKER)	
Polymeeri, entsyymi, sekundaarivasta-aine	EnVision FLEX/HRP	Ultra View Universal DAB Detection Kit
Kromogeeni, substraatti	Substrate Working Solution (mix)	Ultra View DAB ja Ultra View DAB H2O2
Kuparisulfaatti		Ultra View Copper
Taustavärjäys	Envision FLEX Hematoxylin	Hematoxylin II
Jälkitaustavärjäys		Bluing Reagent
Huuhteluliuos	Wash Buffer	Reaction Buffer

Taulukko 3. KISH-värjäyksen manuaalityövaiheen ja automaattivärjäyksen reagenssit

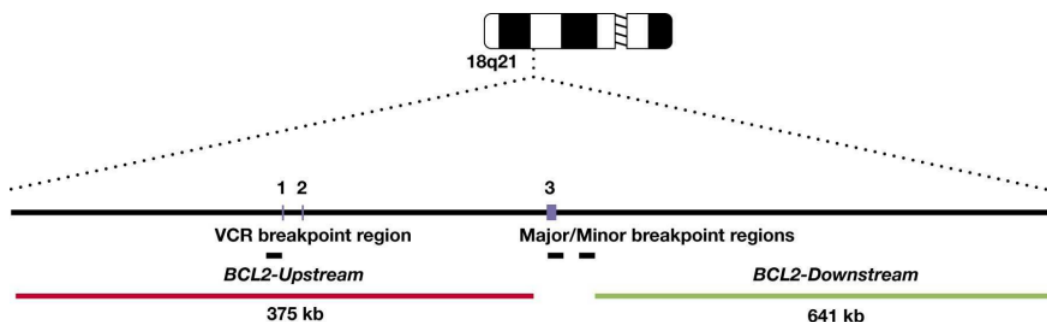
KISH-värjäyksessä tarvittavat reagenssit	
Pesuliuos 1	Wash Buffer (20x)
Pesuliuos 2	Stringent Wash (20x)
Esikäsittelyliuos	Pre-Treatment Solution (20X)
Proteasikäsittelyliuos	Pepsin (ready-to-use)
ALK-koetin	ALK FISH DNA Probe
BCL2-koetin	BCL2 FISH DNA Probe
Peitinlasien tiivistaine	Coverslip Sealant
Peroksidaasinpoistoliuos	Peroxidase Block (ready-to-use)
Vasta-aine	CISH Antibody Mix (ready-to-use) sisältää primaarivasta-aineita konjugoituna piparjuuriperoksidaasiin ja alkaaliseen fosfataasiin
Punainen kromogeeni	Red Chromogen (Fast Red)
Laimennospuskuri 1.	Red Substrate Buffer
Sininen kromogeeni	Blue Chromogen (syaaninsininen)
Laimennospuskuri 2.	Blue Substrate Buffer

KISH-värjäyksissä käytetty ALK-koetin (ALK FISH DNA Probe, Split Signal Code Y5417) on suunniteltu käytettäväksi ALK-geenilokuksessa tapahtuvan translokaation havaitsemiseksi. Koetin koostuu kahdesta DNA-koettimesta, jotka hybridisoituvat tunnetun katkeamiskohdan molemmin puolin. Toinen koettimesta on Texas Red -leimattu (punainen) ja se tarttuu katkeamiskohdan telomeeriselle puolelle. Toinen koetin on FITC-leimattu (vihreä) ja se tarttuu katkeamiskohdan sentromeeriselle puolelle. (Dako 2011a; Kuva 15; LIITE 7.) Koettimet visualisoidaan Dako DuoCISH™-reaktiokittiin kuuluvalla Antibody mixillä, joka muuntaa fluoresoivan Texas Red -signaalin punaiseksi ja fluoresoivan FITC-signaalin siniseksi kromogeeniseksi signaaliksi (Luku 3.3). Mikäli geenialue on ehjä, signaalit nähdään yhdessä. Jos geenialueella on tapahtunut translokaatio eli geenialueen siirtyminen, signaalit nähdään erillään. (Dako 2011a; LIITE 7.)



Kuva 15 ALK FISH DNA-koetin (Dako 2011a)

KISH-värjäyksissä käytetty BCL2-koetin (BCL2 FISH DNA Probe, Split Signal Code Y5407) on suunniteltu käytettäväksi BCL2-geenilokuksessa tapahtuvan translokaation havaitsemiseksi. Kuten ALK-koetinkin, BCL2-koetin sisältää kaksi eri fluoresoivilla aineilla leimattua DNA-koetinta, jotka hybridisoituvat tunnetun katkeamiskohdan molemmin puolin (sentromeerinen ja telomeerinen). (Dako 2011b; Kuva 16; LIITE 8.) Koettimet visualisoidaan Dako DuoCISH™ Antibody mixin avulla (Luku 3.3). Mikäli translokaatio on tapahtunut tunnetussa katkeamiskohdassa (major/minor), signaalit nähdään erillään toisistaan. (Dako 2011b; LIITE 8.)



Kuva 16 BCL2 FISH DNA-koetin (Dako 2011b)

## 7.6 Laboratoriotyövaiheen valmistelu

Laboratoriotyövaiheen valmisteluun kuului laboratoriotilojen valmistelu sekä näytteitten leikkaaminen ja kiinnittäminen näytelaseille. Optimaalinen leikepaksuus IHK-näytteille on 3–4 µm ja KISH-näytteille on 2–3 µm (Dako 2012a; Farmilo & Stead 2009, 32). Kaikista näyteblokeista leikattiin mik-

rotomilla 3–4 µm paksuiset leikkeet objektilaseille. Näytelaseja tehtiin vähintään kuusi kappaletta jokaisesta näytteestä, koska ennalta ei voitu arvioida optimointivaiheessa tehtävien värjäysten määrää. IHK-lasien kiinnitys tehdään 60-°C:ssä uunissa puolen tunnin ajan (Farmilo & Stead 2009, 32). KISH-näytteet inkuboidaan ennen parafiinin poistoa tunnin ajan 60-°C:ssä tai vaihtoehtoisesti 1–2 päivää 37-°C:ssä lämpökaapissa, minkä jälkeen näytteitä inkuboidaan vielä tunti 60 °C:ssä. (Dako 2012a). IHK-näytteet kiinnitettiin KYSin rutiinikäytännön mukaisesti yön yli 37-°C:ssä lämpökaapissa, minkä jälkeen niitä inkuboitettiin vielä tunti 60-°C:ssä uunissa. Suurin osa KISH-näytteistä kiinnitettiin lasille 37-°C:ssä uunissa yön yli. Yksittäisiä näytteitä jouduttiin leikkaamaan tutkimuksen myöhemmissä vaiheissa. Nämä näytteet kiinnitettiin 60-°C:ssä uunissa tunnin ajan.

## 7.7 Immunohistokemialliset värjäykset

ALK- ja BCL2-tutkimusnäytteet värjättiin KYSin immunohistokemian laboratoriossa rutiinikäytössä olevilla IHK-värjäysohjelmilla (Taulukko 4; LIITE 3; LIITE 6). Ensimmäisten IHK-värjäysten jälkeen ALK-näytteistä tehtiin normaaliprotokollasta poikkeava IHK-värjäys, jossa esikäsittelyliuos vaihdettiin TRIS/EDTA pH 9 -esikäsittelyliuoksesta sitraatti pH 6 -esikäsittelyliuokseen. Lisäksi vasta-ainelaimennos oli puolta vahvempi (1:50) ja värjäyksessä käytettiin linkkeriä (EnVision FLEX +) primaarivasta-aineen ja polymeeriin sidotun sekundaarivasta-aineen välillä. Värjäyksessä linkkerin inkubaatioaika oli 15 minuuttia. (LIITE 4.) IHK-värjäysten perusteella valittiin näytteet KISH-menetelmän optimointiin.

Taulukko 4 Tutkimuksessa käytetyt IHK-värjäysprotokollat

Työvaihe	ALK		BCL2	
Esikäsittelyvaihe	Dako Pt Link 3in1 TRIS/EDTA pH 9 ja Citrate buffer pH 6 (parafiinin poisto, esikäsittely, dehydraatio)	20 min 97 °C	EzPrep (parafiinin poisto)	4 min 76 °C
Peroksidaasin poisto	EnVision FLEX Peroxidase- Blocking Reagent	5 min	Cell Conditioner 1 (esikäsittely)	8 min 95 °C
Primaarivasta-aine	Novocastra Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody p 80 (ALK)	20 min	UV INHIBITOR	4 min
Linkkeri	EnVision Flex + Mouse (LINKER)	15 min	Anti-BCL-2 (SP66) Rabbit Monoclonal Primary Antibody	32 min
Entsyymi Sekundaarivasta-aine	EnVision FLEX/HRP	20 min	UV HRP UNIV	8 min
Kromogeeni Substraatti	Substrate Working Solution	10 min	UV DAB ja UV DAB H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8 min
Kuparisulfaatti			UV Copper	4 min
Taustavärjäys	Hematoksyliini	5 min	Hematoksyliini	4 min

## 7.8 Kromogeenisen in situ hybridisaation optimointi

KISH-menetelmän optimoinnissa käytettiin Dakon esivalidoituja menetelmäohjeita Histology FISH Accessory Kit (Dako 2012a) ja Dako DuoCISH™ (Dako 2012b) sekä Step-by-Step FISH Procedure for Histology Samples -ohjetta (LIITE 10). BCL2-värjäyksissä noudatettiin perusvärjäysprotokollaa ja ALK-värjäyksissä muunneltua protokollaa (LIITE 11). Muunneltu protokolla poikkeaa perusprotokollasta sinisen kromogeenilaimennoksen ja näytteitten taustavärjäyksen suhteen. BCL2-näytteitten värjäyksessä sininen kromogeenilaimennos on puolet vahvempi ja näytteille käytetään hematoksyliini-taustavärjäystä. Muunnellussa protokollassa sinisen kromogeenin laimennossuhde on 1:28 ja perusprotokollassa 1:14. Punaisen kromogeenin laimennossuhde molemmissa protokollissa on 1:101. (Dako 2012b.)

KISH-värjäykset tehtiin seuraavissa taulukoissa kuvattujen työvaiheiden mukaisesti (Taulukko 5; Taulukko 6; Taulukko 7). Värjäykseen tarvittavat muutokset tehtiin Dakon menetelmäohjeiden perusteella (Dako 2012a; Dako 2012b; LIITE 10; LIITE 11).

Taulukko 5 KISH-värjäysprotokollan ensimmäisen päivän työvaiheet

Ensimmäisen päivän työvaiheet	
Liuosten laimentaminen	Wash Buffer 1:20 Pre-Treatment Solution 1:20
Parafiinin poisto	3 x 5 min ksyleeni
Rehydraatio	2 x 5 min 96 % etanoli 2 x 5 min 100 % etanoli
Pesu	Wash Buffer
Esikäsitteily	10 min 95–99 °C Pre-Treatment Solution
Jäähdytys	15 min huoneenlämmössä
Pesu	2 x 3 min Wash Buffer
Proteaasikäsitteily	5–8 tippaa kylmää (2–8 °C) pepsiiniä (ready-to-use) inkubaatio huoneenlämmössä <b>Käsittelyaika optimoitava</b>
Pesu	2 x 3 min Wash Buffer
Dehydraatio	2 min 70 % etanoli (2–8 °C) 2 min 96 % etanoli (2–8 °C) 2 min 100 % etanoli (2–8 °C)
Ilmakuivaus	15–20 min vetokaapissa
Koettimen lisääminen peitinlasin tiivistäminen	10–15 µl Probe Mix Coverslip Sealant
Denaturointi	5 min 82 °C lämpölevyllä
Hybridisaatio	14–20 h 45 °C lämpökaapissa

Käyttäjän on itse määritettävä proteaasikäsitteilytapa ja optimaalinen proteaasikäsitteilyaika (Taulukko 5). Opinnäytetyötutkimuksessa proteaasikäsitteily tehtiin huoneenlämmössä vetokaapissa. Dakon

(2012a) mukaan proteaasikäsittelyn inkubointiaika huoneenlämmössä voi vaihdella 5–50 minuuttiin, mutta suurimmalle osalle näytteistä riittää 10–12 minuuttia.

Denaturaatioon käytettiin lämpölevyä ja hybridisaatioon muovista koteloa automaattisen hybridisaattorin (Dako Hybridizer) sijasta (Taulukko 5). Kotelossa oli vedellä kostutettua vaahtomuovia kosteuden säilyttämiseksi. Näytteet laitettiin denaturaation jälkeen lämpökaapissa esilämmitettyyn koteloon, joka laitettiin 45-°C:seen lämpökaappiin. Näytteet hybridisoituivat lämpökaapissa yön yli.

Hybridisaation jälkeen näytteille tehdään Stringent-pesu sitoutumattomien ja väärin sitoutuneiden koettimien poistamiseksi. Tiivistaine poistetaan peitinlasien päältä ja näytelasit pestään huoneenlämpöisessä Stringent-pesupuskurissa, jossa peitinlasien annetaan irrota näytteitten päältä. Kun peitinlasit ovat irronneet, näytteet pestään 65-°C:ssä Stringent-pesupuskurissa tarkalleen 10 minuutin ajan, minkä jälkeen ne pestään vielä huoneenlämpöisessä pesupuskurissa. (Taulukko 6.)

Taulukko 6. KISH-värjäysprotokollan toisen päivän työvaiheet

Toisen päivän työvaiheet	
Liuosten laimennossuhteet	Stringent Wash Buffer laimennos 1:20
Stringent Buffer -pesu 1.	huoneenlämmössä Stringent Wash Buffer kunnes peitinlasit ovat irronneet
Stringent Buffer -pesu 2.	10 min 65 °C Stringent Wash Buffer
Wash Buffer	2 x 3 min Wash Buffer
Kromogeenilaimennosten teko BCL2-värjäyksissä	PUNAINEN: Yhtä millilitraa (1 ml) laimennospuskuria (Red Substrate Buffer) kohti lisätään 10 µl punaista kromogeenia (Red Chromogen)
	SININEN: Yhtä millilitraa (1 ml) laimennospuskuria (Blue Substrate Buffer) kohti lisätään 75 µl sinistä kromogeenia (Blue Chromogen)
Kromogeenilaimennosten teko ALK-värjäyksissä	PUNAINEN: Yhtä millilitraa (1 ml) laimennospuskuria (Red Substrate Buffer) kohti lisätään 10 µl punaista kromogeenia (Red Chromogen)
	SININEN: Yhtä millilitraa (1 ml) laimennospuskuria (Blue Substrate Buffer) kohti lisätään 37,5 µl sinistä kromogeenia (Blue Chromogen)

Kromogeenien laimentamiseen käytetään Dakon käyttövalmiita puskureita (Red Substrate Buffer, Blue Substrate Buffer). Sininen kromogeeni tulee valmistaa vähintään 30 minuuttia ennen käyttöä ja punainen kromogeeni tulee käyttää 20 minuutin kuluttua valmistuksesta (Dako 2012b). Kromogeenilaimennosten kokonaistilavuus lasketaan näytemäärän mukaan. Värjäysautomaatti tarvitsee 200 µl kromogeenilaimennosta näytelasia kohti ja 600 µl ylimääräistä liuosta (niin sanottu kuollut tilavuus), joten esimerkiksi neljälle näytteelle tarvittava määrä laimennosta on 1400 µl.

Stringent-pesun läpikäyneet näytteet värjätään loppuun värjäysautomaatissa. Värjäystä varten näytteet asetetaan värjäysautomaatin värjäystelineeseen ja peitetään pesupuskurilla kuivumisen estämiseksi. Alla näkyvässä taulukossa on Dako Autostainer -värjäysautomaatin työvaiheet ja työvaiheitten inkubaatioajat (Taulukko 7; LIITE 9). Automaattivärjäyksessä käytettävät liuokset Peroxidase Block ja CISH Antibody Mix ovat käyttövalmiita liuoksia. Työvaiheiden välillä tapahtuvia pesuvaiheita ei ole merkitty taulukkoon.

Taulukko 7 Dako Autostainerin työvaiheet (pesuvaiheita ei ole merkitty)

Reagenssi	Inkubaatioaika
Peroxidase Block	5 min
CISH Antibody Mix	30 min
Red Chromogen Solution	10 min
Blue Chromogen Solution	10 min
Diluted Hematoxylin (korvattiin pesupuskurilla)	5 min

Automaattivärjäyksen jälkeen näytteitä ilmakeivataan 15–20 minuuttia vetokaapissa. Ilmakeivattujen näytteitten päällystämiseksi tulee käyttää vesipohjaisia päällystysaineita alkoholi- ja ksyleenipohjaisten sijasta, sillä alkoholi ja ksyleeni liuottavat kromogeeneja (Dako 2012b.) Kun päällystysaine on kuivunut, lasit ovat valmiita mikroskoipoitaviksi.

Opinnäytetyötutkimuksen KISH-värjäykset tehtiin kahdeksassa värjäyssarjassa edellä kuvattujen työvaiheiden mukaisesti. Värjäysprotokollan optimoidut työvaiheet kuvataan seuraavana.

**Koetin** Koettimen sopivaksi määräksi Dako (2012a) esittää 10–15 µl, joka todettiin käytetyille näytteille sopivaksi. KISH-värjäyksissä koettimen määrä riippui näytteen koosta; pienille näytteille käytettiin 10 µl koetinta ja suuremmille 15 µl.

**Proteaasikäsittely** Proteaasikäsittely suoritettiin inkuboimalla näytteitä huoneenlämmössä vetokaapissa. Käsittelyn pituuden määrittämiseksi tutkimuksessa kokeiltiin ensin 12 minuutin käsittelyaikaa sekä ALK- että BCL2-näytteille. Ensimmäisten värjäysten jälkeen siirryttiin molempien kohdalla käyttämään 15 minuutin käsittelyaikaa, mikä todettiin sopivaksi. Pipetoitavan pepsiniin määrä riippui lasilla olevan näytteen koosta. Pepsiniin määrä oli riittävä, kun näyte peittyi.

**Taustavärjäys** Optimointityössä ei käytetty Dakon suosittelemaa ja Autostainer-värjäysautomaatin värjäysohjelmaan kuuluvaa hemotoksyliini-taustavärjäystä BCL2-näytteillä. Myöskään ALK-näytteille ei käytetty hematoksyliini-taustavärjäystä, koska se ei kuulunut muunneltuun värjäysprotokollaan.

## 7.9 Näytteitten analysointi

Näytteitten analysointia varten kaikki menetelmien vertailuun valitut kymmenen näytettä valokuvattiin Leican Application Suite (LAS) -kuvausohjelmalla. Opinnäytetyöraportissa esiintyvät kuvat on



otettu työn tässä vaiheessa ja lista kuvista on liitteenä (LIITE 12). Kunkin näytteen IHK-värjätystä lasista otettiin kuva 10x-suurennoksella IHK-positiiviselta alueelta. Kuvan avulla etsittiin ja kuvattiin vastaava kohta KISH-näytteestä käyttäen 40x-suurennosta. Kustakin näytteestä pyrittiin ottamaan riittävästi kuvia, jotta näytteestä saataisiin vähintään sata solua laskettua. Osasta näytteitä laskettiin useampia sadan solun otoksia käyttäen yhtä tai useampaa kuvaa, kun taas joidenkin näytteitten tulokset arvioitiin yhdestä alle sadan solun otoksesta. Pienin laskettujen solujen määrä oli 74 solua. Otetut kuvat analysoitiin kuvankäsittelyohjelmalla, jolla pystyttiin merkitsemään lasketut solut. Kaikista näytteistä laskettiin translokaatioposiitivisten solujen osuus laskettujen solujen kokonaismäärästä. Tulos ilmoitettiin prosentteina.

Translokaatioiden tulkitsemisen apuna käytettiin Dakon DuoCISH-kitin ohjetta. Ohjeen mukaan analysoitavien signaalien tulee olla selviä, voimakkuudeltaan tasaisia ja pyöreitä sekä helposti laskettavissa. Normaalisti solussa, joka on selvästi erotettavissa muista soluista, on 1–2 selvää punaista ja 1–2 selvää sinistä signaalia. Jos signaalit eivät erotu soluissa, värjäys on epäonnistunut. Tumien tulee olla ehjiä. Jos näytteessä on havaittavissa useita hajonneita soluja, proteaasikäsittelyaika on liian pitkä, eikä näytteestä voida arvioida signaaleja luotettavasti. Vaihteleva fiksaatio, kuduskäsittely ja parafiinivalu voivat aiheuttaa vaihtelevia tuloksia. Translokaation tapahduttua sininen ja punainen signaali ovat selvästi erillään toisistaan. Jos solusta ei ole täyttä varmuutta, se pitää jättää laskematta. (Dako 2012b.)

Monikudosblokkien tulosten arvioinnissa käytettiin samaa periaatetta kuin muidenkin näytteitten kohdalla. Monikudosblokit MB 1, MB 2 ja MB 3 käytiin läpi näyte kerrallaan, mutta niistä ei kuvattu kuin IHK-positiiviseksi oletetut näytteet. Yhteensä 216 näytteestä kuvattiin 14. Kaikki IHK-positiiviseksi oletetut alueet käytiin läpi KISH-laseista translokaatioiden varalta.

## 8 TUTKIMUSTULOKSET

Opinnäytetyössä selvitettiin KISH-menetelmän optimointitarve formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille, onko KISH-värjäystulos yhtenevä IHK-värjäystuloksen kanssa käytetyllä näytemateriaalilla ja voidaananko KISH-menetelmää käyttää vaihtoehtomenetelmänä tutkittujen syöpien diagnostiikassa. Työssä ALK1-koettimen toimivuutta tutkittiin neuroblastooman, ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman ja anaplastisen suurisolulymfooman näytteillä ja BCL2-koettimen toimivuutta follikulaarisen lymfooman näytteillä. Opinnäytetyön tutkimuskysymyksiä olivat:

1. Miten translokaatiokoettimet toimivat diagnostiikassa käytettäville formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille?
2. Onko kromogeenisen in situ hybridisaation tulos yhtenevä immunohistokemiallisen värjäystuloksen kanssa?
3. Onko kromogeeninen in situ hybridisaatio käyttökelpoinen vaihtoehtomenetelmä immunohistokemian värjäykselle tutkittujen syöpien diagnostiikassa?

### 8.1 Translokaatiokoettimien toimivuus

Opinnäytetyössä käytettiin KISH-menetelmän optimointiin Dakon esivalidoituja menetelmäohjeita (Dako 2012a; Dako 2012b; LIITE 10) ja koetinkohtaisia ohjeita (LIITE 11), joihin tehtiin muutoksia saavutettujen värjäystulosten perusteella Dakon ohjeisiin pohjaten. Menetelmän optimointi tehtiin KYSin patologian laboratoriossa käytössä olevilla fiksaatio- ja kuduskäsittelymenetelmillä valmistetuille näytteille. KISH-menetelmän optimointitarve oli opinnäytetyössä pieni, mutta menetelmä osoitautui ongelmaherkäksi ja huonosti toistettavaksi. Ongelmia ilmeni muun muassa punaisen kromogeenin säilyvyyden suhteen. Pohdintaosiossa käsitellään tarkemmin KISH-menetelmän ongelmaherkyyttä menetelmän optimointia arvioitaessa (Luku 9.1).

Translokaatiokoettimet saatiin toimimaan diagnostiikassa käytettäville formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille. BCL2-näytteet toimivat Dakon esittämän standardiprotokollan mukaan ja ALK-näytteet Dakon esittämän muunnellun protokollan mukaan (LIITE 11). BCL2-näytteille ei tutkimuksessa käytetty protokollan mukaista taustavärjäystä. Optimaalinen proteaasikäsittelyaika ALK- ja BCL2-näytteille on tutkimuksen mukaan 15 minuuttia.

KISH-värjäysprotokollassa muuttuvia työvaiheita proteaasikäsittelyn ja taustavärjäyksen lisäksi olivat kromogeenilaimennosten ja koettimien määrät. Koettimen määrä oli riippuvainen näytteen koosta ja kromogeenilaimennosten määrä näytemäärästä ja käytetystä koettimesta, joten näillä työvaiheilla ei ollut menetelmän optimoinnin kannalta merkitystä. Koettimen sopivaksi määräksi todettiin työohjeessa esitetty 10–15 µl: pienemmille näytteille pipetoitiin 10 ja suuremmille 15 µl. Kromogeenilaimennosten teossa noudatettiin työohjeissa annettuja laimennosohjeita.

Kuopion yliopistollisen sairaalan kliinisen patologian yksikköön otettiin optimointityössä käytetyn muunnellun ALK-IHK-värjäyksen pohjalta käyttöön uusi IHK-värjäys keuhkonäytteitten diagnostiik-

kaan. Normaalista ALK-värjäyksestä (LIITE 3) poiketen värjäyksessä (LIITE 4) käytettiin vahvempaa vasta-ainelaimennosta (1:50), linkkeriä (EnVision FLEX +) ja esikäsittelyliuos vaihdettiin TRIS/EDTA pH 9 -esikäsittelyliuoksesta sitraatti pH 6 -esikäsittelyliuokseen. KYSin patologialle käyttöönotetussa värjäyksessä vasta-ainelaimennos on opinnäytetyössä käytettyä puolet vahvempi (1:25).

## 8.2 IHK- ja KISH-menetelmien vastaavuus

KISH-menetelmän vastaavuus IHK-menetelmään vaihteli syöpätyypeittäin. Seuraavissa taulukoissa on esitetty syöpätyypeittäin saadut IHK- ja KISH-värjäystulokset (Taulukko 8; Taulukko 9; Taulukko 10; Taulukko 11). Taulukoissa esitetään IHK-värjäystulokset, joiden perusteella valittiin näytteet KISH-menetelmän optimointiin. Optimoinnissa käytetyistä näytteistä laskettiin translokaatioposiitiivisten solujen osuus kaikista lasketuista soluista. Tulosten perusteella tehtiin arvio IHK- ja KISH-menetelmien vastaavuudesta.

**Neuroblastooma** Tutkimuksessa käytetyt viisi neuroblastoomanäytettä olivat kaikki selvästi ALK-proteiinin ilmentymisen suhteen positiivisia, mutta yhdessäkään ei havaittu translokaatioita. Saatujen tulosten perusteella IHK- ja KISH-menetelmät eivät vastanneet toisiaan.

Taulukko 8 Neuroblastooman värjäystulokset

Näyte	IHK 1	IHK 2	KISH	Translokaatioita/ lasketut solut
NBL 1	negatiivinen	positiivinen	negatiivinen	0/100 = 0 %
NBL 2A	epäselvä	positiivinen	negatiivinen	0/100 = 0 %
NBL 2B	positiivinen	positiivinen	negatiivinen	0/100 = 0 %
NBL 3A	epäselvä	positiivinen		
NBL 3B	epäselvä	positiivinen		
NBL 3C	negatiivinen	negatiivinen		

**Ei-pienisoluisen keuhkokarsinoma** Optimointityössä käytetty ei-pienisoluisen keuhkokarsinoman näyte (NSCLC 1) osoitti hyvin vähäistä ALK-proteiinin ilmentymistä ja translokaatioposiitivisuutta (2 %). Keuhkonäytteitten monikudosblokeilla ei saavutettu odotettua hyötyä ei-pienisoluisen keuhkokarsinoman näytteitten analysoinnissa. Menetelmien vastaavuutta ei voitu tutkimuksessa selvästi osoittaa.

Taulukko 9 Ei-pienisoluisen keuhkokarsinoman värjäystulokset

Näyte	IHK 1	IHK 2	KISH	Translokaatioita/ lasketut solut
NSCLC 1	negatiivinen	positiivinen	positiivinen	2/100 = 2 %
NSCLC 2	negatiivinen	negatiivinen		

**Anaplastinen suurisolulymfooma** Optimoinnissa käytetyssä anaplastisen suurisolulymfooman näytteessä havaittiin translokaatioita ALK-proteiinin ilmentymisen suhteen positiivisilta alueilta suurella prosentuaalisella osuudella. KISH-menetelmän testauksessa käytetyn näytteen kohdalla IHK- ja KISH-tulokset vastasivat toisiaan.

Taulukko 10 Anaplastisen suurisolulymfooman värjäystulokset

Näyte	IHK 1	IHK 2	KISH	Translokaatioita/ lasketut solut
ALCL 1A	negatiivinen	negatiivinen		
ALCL 1B	negatiivinen	negatiivinen		
ALCL 2	positiivinen	positiivinen	positiivinen	194/300 = 64,67 %

**Follikulaarinen lymfooma** Viidestä follikulaarisen lymfooman tutkimusnäytteestä löytyi BCL2-proteiinia ilmentäviltä alueilta runsaasti translokaatioita, joten menetelmien tulokset vastasivat kiitettävästi toisiaan. Yksi tutkimusnäytteistä (FL 6) oli normaalista imusolmukkeesta ja tiedettiin etukäteen IHK-negatiiviseksi.

Taulukko 11 Follikulaarisen lymfooman värjäystulokset

Näyte	IHK	KISH	Translokaatioita/ lasketut solut
FL 1	positiivinen	positiivinen	64/186 = 34,41 %
FL 2	positiivinen	positiivinen	98/150 = 65,33 %
FL 3	positiivinen	positiivinen	215/370 = 58,11 %
FL 4	positiivinen	positiivinen	30/74 = 40,54 %
FL 5	positiivinen	positiivinen	164/300 = 54,67 %
FL 6	negatiivinen	negatiivinen	0/100 = 0 %

Seuraavassa taulukossa (Taulukko 12) esitetään yhteenvetona KISH-menetelmän optimoinnissa käytettyjen näytteitten IHK- ja KISH-tulokset, translokaatioiden prosentuaalinen osuus lasketuista soluista ja menetelmien vastaavuus. Pohdintaosiossa tarkastellaan laajemmin syöpätyypeittäin optiointiprosessin etenemistä ja saavutettuja tuloksia (Luku 9.2).

Taulukko 12 Yhteenveto optimoinnissa käytetyistä näytteistä ja menetelmien vastaavuudesta

Syöpätyyppi	Näyte	IHK-tulos	Translokaatioita/ lasketut solut	Vastaavuus
Neuroblastooma	NBL 1	Vähän ALK-positiivisuutta	0/100 = 0 %	Ei
	NBL 2A	ALK -positiivinen	0/100 = 0 %	Ei
	NBL 2B	ALK -positiivinen	0/100 = 0 %	Ei
Ei-pienisoluihin keuhkokarsinoma	NSCLC 1	Vähän ALK-positiivisuutta	2/100 = 2 %	Kyllä/Ei
Anaplastinen suurisolulymfoma	ALCL 2	ALK -positiivinen	194/300 = 64.67 %	Kyllä
Follikulaarinen lymfoma	FL 1	BCL2 -positiivinen	64/186 = 34.41 %	Kyllä
	FL 2	BCL2 -positiivinen	98/150 = 65.33 %	Kyllä
	FL 3	BCL2 -positiivinen	215/370 = 58.11 %	Kyllä
	FL 4	BCL2 -positiivinen	30/74 = 40.54 %	Kyllä
	FL 5	BCL2 -positiivinen	164/300 = 54.67 %	Kyllä

### 8.3 KISH-menetelmän hyödynnettävyys

Opinnäytetyötutkimuksen perusteella KISH-menetelmällä ei kannata korvata IHK-rutiinivärjäystä. KISH voi toimia IHK-diagnoosia tarkentavana menetelmänä tutkittujen syöpien diagnostiikassa. Opinnäytetyötutkimus osoitti, että KISH-menetelmän käyttöönotossa tarvitaan lisää tutkimuksia, jotta sitä voitaisiin käyttää erillisenä syöpädiagnostisena menetelmänä. Koska menetelmä saatiin toimimaan, voidaan jatkotutkimuksissa keskittyä validoimaan menetelmää tietyille syöpätyypille, ilman että värjäysprotokollan toimivuuteen tarvitsee kiinnittää erityishuomiota. KISH-menetelmän hyödynnettävyyttä on pohdittu edelleen pohdinnassa tulosten merkitystä tarkasteltaessa (Luku 9.4).

## 9 POHDINTA

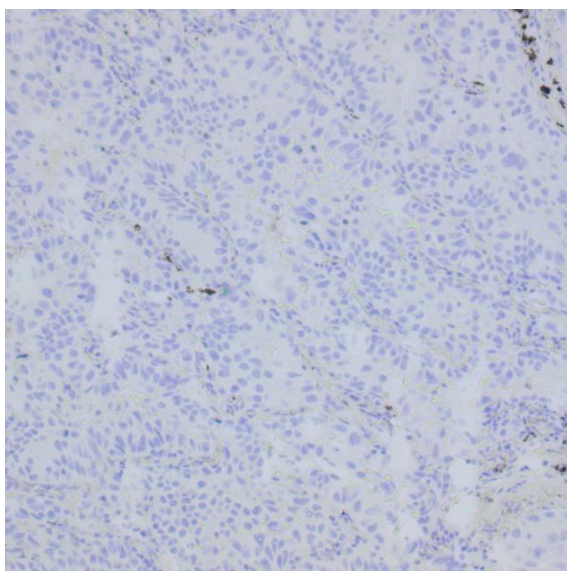
Pohdintaosiossa arvioidaan KISH-menetelmän optimointiprosessia ja sitä, kuinka translokaatiokoetimet saatiin toimimaan. Tämän jälkeen tarkastellaan saavutettuja IHK- ja KISH-värjäystuloksia syöpätyypeittäin ja menetelmien vastaavuutta. Lopuksi pohditaan tulosten luotettavuutta tutkimusprosessin ja tutkimustulosten osalta, tulosten merkitystä ja hyödynnettävyyttä, tutkimuksen eettisyyttä sekä arvioidaan opinnäytetyön kautta saavutettua ammatillista kasvua. Pohdintaosio menetelmän optimoinnin arvioinnista tarkastelee ensimmäistä tutkimuskysymystä eli kuinka translokaatiokoetimet saatiin toimimaan. Toiseen tutkimuskysymykseen eli menetelmien vastaavuuteen vastataan tulosten arviointi -osiossa. Sitä, onko KISH käyttökelponen vaihtoehtomenetelmä IHK-värjäyksille tutkittujen syöpien diagnostiikassa, pohditaan tulosten merkitystä tarkasteltaessa.

Opinnäytetyötutkimuksen perusteella KISH-menetelmä toimii KYSin kliinisen patologian laboratoriossa käytössä olevilla fiksaatio- ja kuduskäsittelymenetelmillä. Käytetyillä syöpänäytteillä saatiin onnistuneita KISH-värjäyssarjoja, joilla voitiin arvioida translokaatiopositiivisuuden ja proteiinin ilmentymisen vastaavuutta. IHK- ja KISH-menetelmät vastasivat hyvin kaikilla follikulaarisen lymfooman näytteillä ja ainoalla optimoinnissa käytetyllä anaplastisen suurisolulymfooman näytteellä. Opinnäytetyötutkimuksen perusteella menetelmät eivät vastanneet toisiaan neuroblastoomanäytteillä. Eipienisoluisen keuhkokarsinooman näytteillä ei saavutettu tuloksia, jotka olisivat kertoneet luotettavasti menetelmien vastaavuudesta. Opinnäytetyötutkimuksen perusteella KISH-menetelmä ei korvaa IHK-rutiinivärjäyksiä.

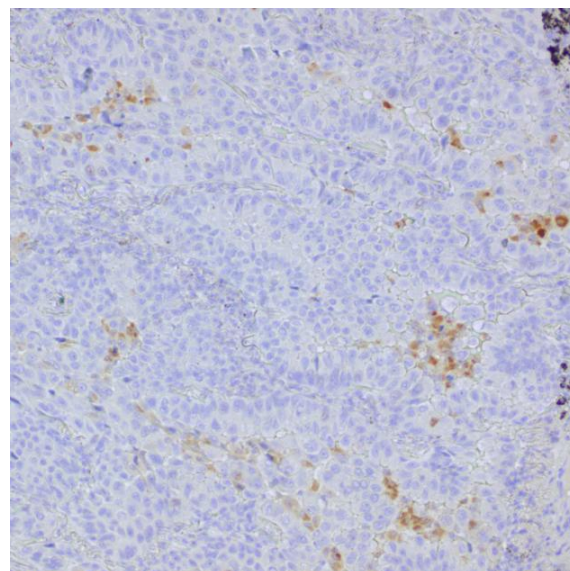
### 9.1 Optimointiprosessin arviointi

Opinnäytetyössä tutkimusnäytteet värjättiin IHK-värjäyksillä, joiden perusteella valittiin näytteet KISH-menetelmän optimointiin. BCL2-näytteet värjättiin KYSin kliinisen patologian yksikössä rutiinikäytössä olevalla, validoidulla IHK-värjäyksellä (LIITE 6). Kaikki ALK-tutkimusnäytteet värjättiin validoidulla IHK-värjäyksellä sekä muunnellun protokollan mukaan (LIITE 3; LIITE 4). Muunneltuun ALK-värjäykseen tehtiin aiemmin tulososiossa (Luku 8.1) kuvatut muutokset, joilla pyrittiin lisäämään IHK-värjäyksessä muodostuvan värin intensiteettiä vähäisimmänkin proteiinin ilmentyminen havaitsemiseksi. Värjäyksessä käytetty linkkeri sitoutuu primaarivasta-aineeseen ja voi sitoa yhteen primaariantigeeniin useampia sekundaariantigeneja (LIITE 5). Vasta-aineen suurempi konsentraatio lisää sitoutuvien vasta-aineiden määrää.

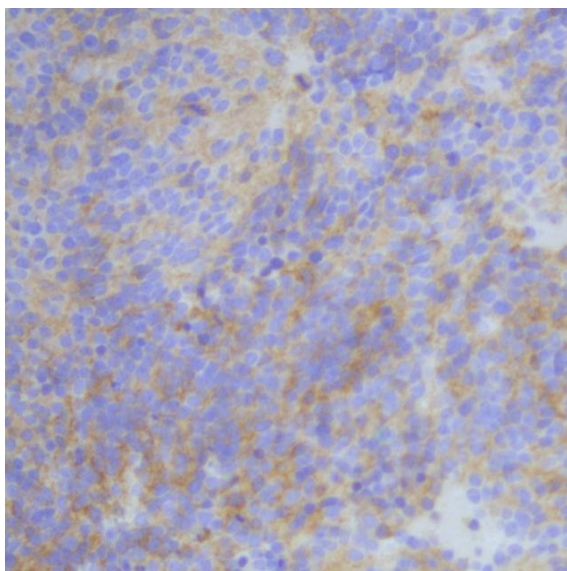
Seuraavissa kuvissa esitetään ALK-IHK-värjäysprotokollan muutoksen vaikutus värjäystulokseen (Kuva 17; Kuva 18; Kuva 19; Kuva 20). Muunneltu protokolla osoittautui käyttökelpoiseksi keuhkonäytteille ja se otettiin käyttöön KYSin patologian yksikössä. Keuhkonäytteille sopivaksi esikäsittelyliuokseksi todettiin sitraattiesikäsittelyliuos (pH 6), vaikka korkeamman pH:n on todettu antavan parempia tuloksia useammilla antigeeni-vasta-aine-pareilla (Kumar & Rudbeck 2009, 51).



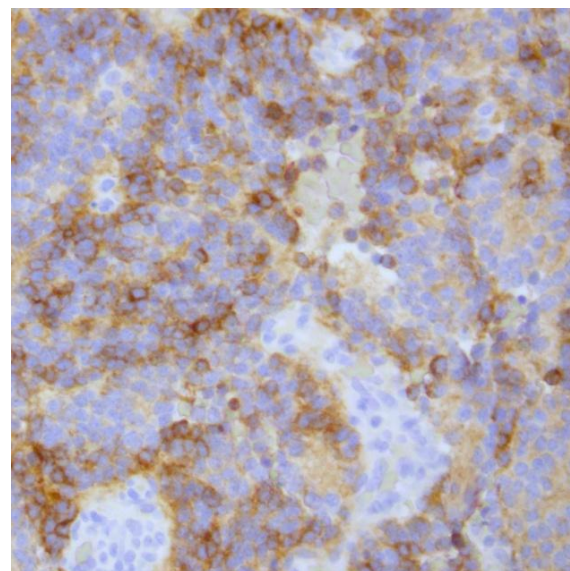
Kuva 17 Keuhkonäytteen (NSCLC 1) IHK-värjäys, vasta-ainelaimennos 1:100 (20x)



Kuva 18 Keuhkonäytteen (NSCLC 1) IHK-värjäys, vasta-ainelaimennos 1:50 (20x)



Kuva 19 Neuroblastoomanäytteen (NBL 2B) IHK-värjäys, vasta-ainelaimennos 1:100 (20x)



Kuva 20 Neuroblastoomanäytteen (NBL 2B) IHK-värjäys, vasta-ainelaimennos 1:50 (20x)

IHK-värjäysten jälkeen suoritettiin KISH-menetelmän optimointi, jossa noudatettiin esivalidoituja työohjeita. Menetelmän validointi tehtiin KYSin patologian laboratoriossa käytössä olevilla fiksaatio- ja kudaskäsittelymenetelmillä valmistetuille näytteille. Esivalidoidut työohjeet tulee optimoida erikseen kunkin laboratorion fiksointi- ja kudaskäsittelymenetelmille, jotta menetelmä toimii luotettavasti. Fiksointi- ja kudaskäsittely vaikuttavat erityisesti proteaasikäsittelyyn, jonka pituuden käyttäjä itse määrittää.

Opinnäytetyötutkimuksessa KISH-menetelmän ainoa optimoitava työvaihe oli proteaasikäsittely. Proteaasikäsittelyn pituus tulee suhteuttaa kudoksen fiksaatioaikaan siten, että pidempään fiksoituneiden näytteitten käsittelyaika on pidempi kuin lyhyemmän fiksaation läpikäyneiden. Usein näytteen fiksaatioaika ei ole tiedossa, joten proteaasikäsittely täytyy pystyä päättämään kudoksen ja näytteen laadun mukaan. Liian lyhyt proteaasikäsittely jättää näytteeseen proteiineja ja peptidiketjuja,

mikä vaikeuttaa koettimen hybridisoitumista DNA:han. Liian pitkä proteaasikäsittely puolestaan tuhoaa kudosta hävittäen DNA:ta sekä solu- ja tumamorfologiaa. (Müller ym. 2009, 67–68.) Proteaasikäsittelyyn on monia vaihtoehtoisia menettelytapoja, joita ovat esimerkiksi inkubointi huoneenlämmössä ja inkubointi 37-°C:ssa lämpökaapissa tai 37-°C:ssa pepsiiniliuoksessa (Dako 2012a). Työn kannalta helpointa oli suorittaa inkubointi huoneenlämmössä vetokaapissa. Molemmille koettimille kokeiltiin 12 minuutin proteaasikäsittelyaikaa, mikä todettiin riittämättömäksi, koska solujen tumat eivät olleet hajonneet riittävästi. Koettimet eivät tästä syystä olleet päässeet kaikkien solujen tumiin, mikä voitiin havaita heikkoina signaaleina. Proteaasikäsittelyaikaa nostettiin 12 minuutista 15 minuuttiin, mikä todettiin molemmille koettimille optimaaliseksi. Pidempi proteaasikäsittelyaika mahdollisti signaalien tarkastelun, mutta ei hajottanut liikaa solurakenteita.

Menetelmän optimoinnissa ALK1-translokaatiokoetin saatiin toimimaan muunnellun protokollan mukaisesti ja BCL2-translokaatiokoetin standardiprotokollan mukaisesti ilman taustavärjäystä (LIITE 11). Taustavärjäys olisi mahdollistanut solujen morfologian tarkemman tutkimisen, mistä kliinikot hyötyvät diagnoosia tehdessään. Voimakas taustavärjäys voi kuitenkin haitata signaalien havaitsemista, joten se jätettiin pois, sillä tarkoituksena oli saada soluihin helposti havaittavat signaalit. BCL2-näytteisiin saatiin perusprotokollalla ilman taustavärjäystä näkyviin selkeitä translokaatiosignaaleja. Näytteitä ei tutkimuksessa verrattu taustavärjättyihin BCL2-näytteisiin. Tästä oli tutkimuksen aikana puhetta, mutta aikomusta ei ehditty toteuttaa.

Tässä tutkimuksessa KISH-menetelmän ongelmana oli huono toistettavuus, sillä vain kaksi värjäyssarjaa kahdeksasta onnistui täysin työohjeen mukaisesti. Värjäyssarjoista kolme epäonnistui, kahden automaattivärjäys korvattiin käsivärjäyksellä ja yksi antoi selittämättömästä syystä vaihtelevia tuloksia. Epäonnistuneista sarjoista yksi oli selitettävissä inhimillisellä virheellä, sillä ALK-näytteitten värjäyksessä noudatettiin perusprotokollaa, vaikka ALK-näytteille on käytettävä muunneltua protokollaa (LIITE 11). Värjäyssarja epäonnistui, koska sinistä kromogeenia käytettiin automaattivärjäyksessä liikaa. Seuraavalla sivulla esitetään neuroblastoomanäytteen (NBL 2B) IHK-värjäys, jossa sinistä kromogeenia on käytetty liikaa, ja saman näytteen onnistunut IHK-värjäys (Kuva 21; Kuva 22).

Punaisen kromogeenin toimimattomuus aiheutti kahden värjäyssarjan epäonnistumisen. Ensimmäisen kohdalla epäiltiin ongelman johtuva kromogeenien puutteellisesta sekoittamisesta, mutta ongelma toistui seuraavassa värjäyssarjassa kromogeenien huolellisesta sekoittamisesta huolimatta. Kun toinenkin värjäyssarja epäonnistui, alettiin epäillä punaisen kromogeenin toimimattomuutta, koska epäonnistuneissa näytteissä ei ollut havaittavissa punaisia signaaleja ja näytteissä oli punaista kromogeenisakkaa. Sivulla 50 on esitetty follikulaarisen lymfoomanäytteen (FL 2) punaisen kromogeenin toimimattomuudesta aiheutunut värjäyksen epäonnistuminen ja saman näytteen onnistunut värjäys (Kuva 23; Kuva 24). Opinnäytetyön ohjaajan aiemman kokemuksen ja tietämyksen perusteella käytetty punainen kromogeeni vaihdettiin uuteen. Kromogeenin vaihdon jälkeen kromogeenistä johtuvia ongelmia ei lopuissa värjäyksistä ilmennyt.

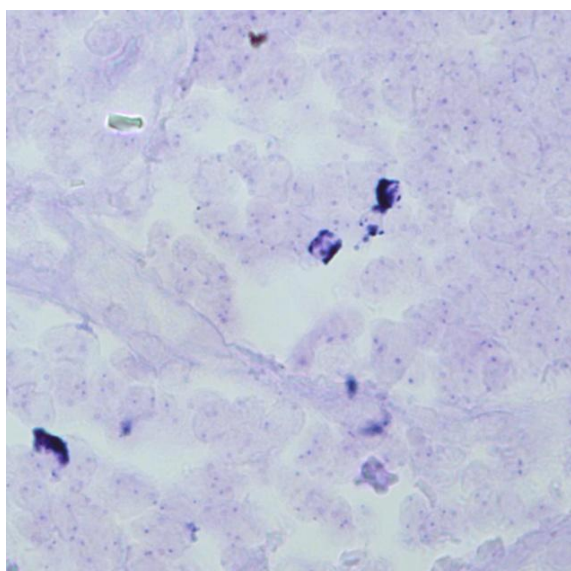
KISH-automaattivärjäyksessä reagenssit kromogeenejä lukuun ottamatta ovat käyttövalmiita liuoksia. Opinnäytetyö osoitti kromogeenilaimennokset yhdeksi värjäyksen ongelmakohdista. Kromo-



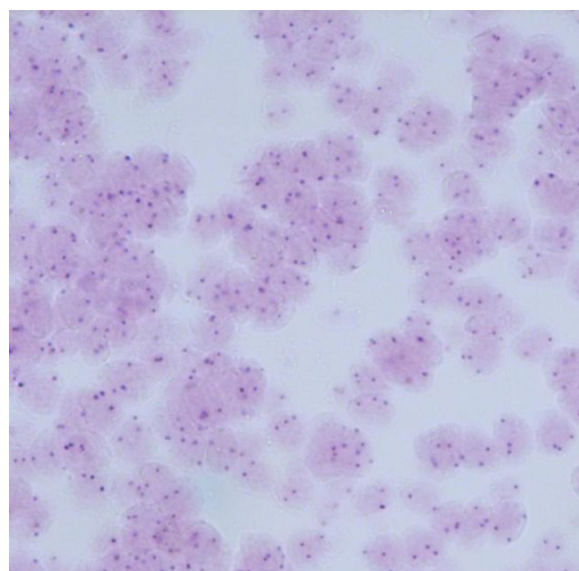
geenilaimennosten teko on huolellisuutta vaativa työvaihe, jossa työntekijän on laskettava ja pipetoitava tarvittavat määrät kromogeenia ja laimennospuskuria. Toisena ongelmana kromogeenien teossa on opinnäytetyössä todettu punaisen kromogeenin huono säilyvyys.

Kahden KISH-värjäyssarjan viimeistely tehtiin automaattivärjäyksen sijasta käsin koneen ohjelman mukaisesti (Taulukko 7). Kun punainen kromogeeni oli päätetty vaihtaa uuteen, yksi värjäyssarja oli ehtinyt jo automaattivärjäysvaiheeseen. Värjäysautomaatin ajo keskeytettiin ja värjäys tehtiin loppuun käsin. Sarjan värjäystulos oli hyvä. Optimointityössä toinenkin värjäyssarja jouduttiin viimeistelemään konevärjäyksen sijasta manuaalisesti. Tämä johtui siitä, että värjäysautomaatin ajo keskeytyi, kun koneen nestepinnan tunnistin ei havainnut reagenssipullostta tarvittavaa määrää reagenssia. Kyseisessä värjäyssarjassa värjättiin ainoastaan kaksi näytettä. Kahdelle näytteelle tarvittava määrä kromogeenilaimennosta on yksi millilitra, joka on minimimäärä, jonka kone reagenssipullostta voi tunnistaa. Ajon keskeytyminen saattoi johtua pipetointivirheestä tai ilmakuplasta reagenssipullossa. Värjäyssarja onnistui viimeistelemällä konevärjäys käsin koneen ohjelman mukaisesti.

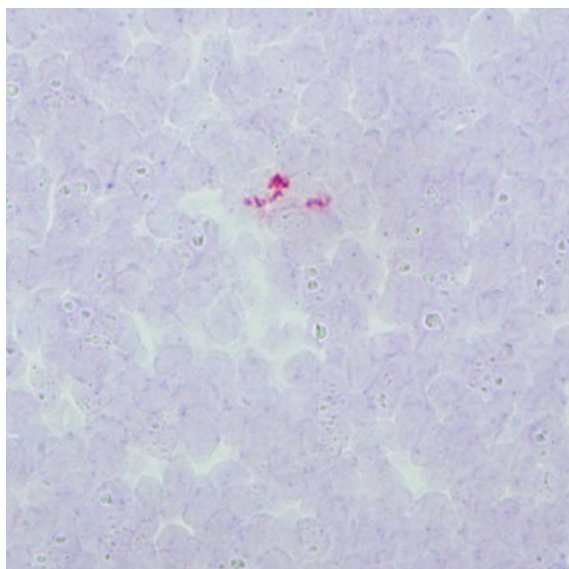
Yhdellä KISH-värjäyssarjoista saatiin vaihtelevia tuloksia. Sarjassa värjättiin sekä ALK- että BCL2-näytteitä niin, että ALK- ja BCL2-näytteet olivat eri aikaan automaattivärjäyksessä. Värjäyssarjassa kaikki BCL2-näytteet onnistuivat, mutta osa ALK-näytteistä epäonnistui tuntemattomasta syystä. Värjäyksen työvaiheet oli suoritettu aiempaa vastaavalla tavalla, joten vaihtelevia tuloksia ei osattu selittää. Kahdeksasta näytteestä viisi onnistui siten, että koettimien signaalit olivat helposti havaittavissa. Ongelma saattoi johtua esimerkiksi näytteitten kuivumisesta, koettimen haihtumisesta hybridisaation aikana tai kromogeenin epätasaisesta levittymisestä automaattivärjäyksessä.



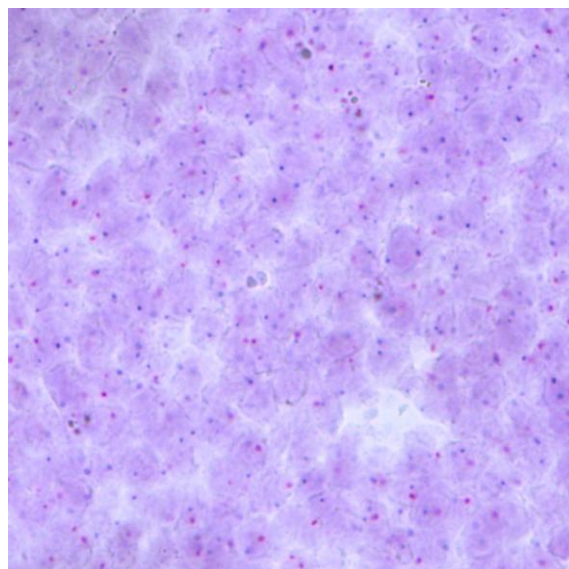
Kuva 21 KISH-värjäys (NBL 2B), jossa liikaa sinistä kromogeeniä (40x)



Kuva 22 Onnistunut neuroblastoomanäytteen (NBL 2B) KISH-värjäys (40x)



KUVA 23 KISH-värjäys (FL 2), jossa punainen kromogeeni on sakannut (40x)



KUVA 24 Onnistunut follikulaarisen lymfooman (FL 2) KISH-värjäys (40x)

## 9.2 Tulosten arviointi

Kaiken kaikkiaan tutkimuksessa oli mukana 17 potilasnäytettä, joista 12 valittiin optimointityöhön. Lisäksi mukana oli kolme keuhkonäytteitten monikudosblokkia, joissa oli yhteensä 216 keuhkonäytettä. Monikudosblokkeja ei käytetty KISH-menetelmän optimointiin, vaan niiden tarkoituksena oli lisätä keuhkonäytteitten määrää. Optimoinnissa käytetyistä näytteistä kaksi jätettiin analysoimatta (NSCLC 2, FL 6), joten tulokset arvioitiin lopulta kymmenestä näytteestä. Saatujen tulosten pohjalta arvioitiin IHC- ja KISH-menetelmien vastaavuutta.

**Neuroblastooma** Tutkimuksessa oli mukana kuusi neuroblastoomanäyteblokkia, joista kolme valittiin KISH-menetelmän optimointiin kahden IHC-värjäyksen jälkeen. Ensimmäisessä IHC-värjäyksessä yksi neuroblastoomanäytteistä oli selvästi positiivinen ALK-proteiinin ilmentymisen suhteen, kaksi näytteistä oli negatiivisia ja kolme epäselviä. Epäselviksi jääneissä näytteissä värjäytyvyys oli niin heikkoa, ettei niitä voinut tulkita selvästi positiivisiksi, muttei myöskään poissulkea selvästi negatiivisina. Muunnellussa IHC-värjäyksessä kaikista epäselväksi jääneestä näytteestä sekä toisesta negatiiviseksi arvioidusta näytteestä saatiin positiiviset tulokset. KISH-värjäykseen valittiin viidestä positiivisesta neuroblastoomanäyteblokista kolme (NBL 1, NBL 2A, NBL 2B), koska loput olivat huonolaatuisia eikä niissä havaittava ALK-proteiinin tuotto ollut runsasta. Kolme menetelmän optimointiin valittua näytettä olivat kauttaaltaan ALK-positiivisia.

Neuroblastoomanäytteissä ei havaittu translokaatioita, vaikka kaikki kolme KISH-menetelmän testauksessa käytettyä näytettä ilmensivät ALK-proteiinia kauttaaltaan. Tulosten perusteella menetelmien ei voitu todeta vastaavan toisiaan. ALK-translokaatioiden puuttuminen selittyy kirjallisuudesta löytyvällä tiedolla, jonka mukaan neuroblastoomissa kaksi yleisintä ALK-mutaatioita ovat pistemutaatioita. Vuonna 2012 tehdyssä tutkimuksessa on hiirikokeilla osoitettu, että ALK-kinaasissa tapahtuva pistemutaatio pystyy itsessään laukaisemaan neuroblastooman synnyn ja ilmenee suurimmassa osassa perinnöllisiä neuroblastoomia ja 10 %:ssa satunnaisesti ilmeneviä. ALK-proteiinin ilmentymiseen joh-

tavia geenimuutoksia voivat olla myös kromosomin 17 monistuma, jota ei myöskään voida käytettyllä translokaatiokoettimella havaita. (Heukamp ym. 2012.) Translokaatiokoettimilla ei voida tutkia yksittäisiä emäksiä, joten neuroblastoomien geenistatuksen selvittelyyn voidaan käyttää menetelmiä, joilla tutkitaan DNA:n emästasolla tapahtuvia muutoksia.

Neuroblastoomassa tulosten tulkinta oli helppoa, vaikka kudoksen rakenne oli todella tiivis. Solujen tiivistä ryhmittymisestä johtuen näytteistä oli helppo todeta translokaatioiden puuttuminen. Tulosten vertaaminen IHK-lasien tuloksiin oli vaivatonta, koska kaikki neuroblastoomanäytteet olivat kauttaaltaan ALK-proteiinin suhteen positiivisia.

Vaikka IHK- ja KISH-menetelmät eivät tämän tutkimuksen perusteella vastanneetkaan, KISH-menetelmän voidaan todeta toimivan neuroblastoomanäytteillä. Neuroblastoomanäytteissä oli mukana vanhimpia tutkimuksessa käytettyjä näytteitä, mikä kertoo parafiiniin valettujen näytteitten säilymisestä.

**Ei-pienisolainen keuhkokarsinoma** Ei-pienisoluisen keuhkokarsinoman näytteet olivat tutkimusnäytteistä kliinisesti merkittävimpiä saatavilla olevien hoitomuotojen vuoksi, ja tästä syystä optimointityöhön pyrittiin saamaan mahdollisimman monta ALK-proteiinin suhteen positiivista näytettä. Tutkimusnäytteitten määrää lisättiin kolmella monikudosblokillä, joissa oli yhteensä 216 keuhkonäytettä. Molempien potilasnäytteitten osoittauduttua ALK-proteiinin suhteen negatiivisiksi värjättiin näytteet vahvemalla IHK-värjäyksellä, jolla pieninkin ALK-positiivisuus voitaisiin havaita. Vahvemman värjäyksen johdosta toinen negatiivisista näytteistä antoi positiivisen tuloksen. Keuhkonäytteitten merkittävyyden takia negatiiviseksi jäänyt näytekin otettiin mukaan KISH-värjäykseen.

KISH-värjäyksissä toinen potilasnäytteistä osoittautui translokaatiopositiiviseksi ja toinen negatiiviseksi. ALK-proteiinituoton suhteen negatiivinen keuhkonäyte hylättiin kahden värjäyksen jälkeen translokaatioiden puutteen ja näytteen huonon laadun vuoksi. KISH-värjäyksissä translokaatiopositiiviseksi osoittautunut näyte oli sama, josta saatiin positiivinen tulos vahvemalla IHK-värjäyksellä. KISH-menetelmän voidaan tulosten perusteella todeta toimivan, koska menetelmällä saavutettiin näytteille sekä negatiivisia että positiivisia tuloksia. Otoksen pienestä koosta ja translokaatiopositiivisten solujen pienestä määrästä johtuen ei IHK- ja KISH-menetelmien tuloksia voida verrata täysin luotettavasti toisiinsa.

Keuhkonäytteitten monikudosblokeilla lisättiin tutkimuksessa keuhkonäytteitten määrää. Monikudosblokit värjättiin käyttäen potilasnäytteillä käytettäviä värjäysmenetelmiä ja niiden analysoinnissa edettiin samoja periaatteita noudattaen. Monikudosblokkeja ei voitu käyttää menetelmän optimointiin, koska niissä olevien näytteitten fiksaatio- ja kudokäsittelyprosessien tiedettiin vaihtelevan. Monikudosblokkeja analysoitaessa kuvattiin IHK-positiivisena 14 näytettä, mutta näistä näytteistä ainoastaan yksi osoittautui ALK-proteiinia ilmentäväksi. Muut kuvatut alueet saattoivat olla kromogeenisakkaa, värjäytynyttä pigmenttiä tai värjäysartefaktaa, sillä samat kohdat näkyivät KISH-laseissa ruskeaksi värjäytyneinä. Vain oikeaksi todetusta IHK-positiivisesta näytteestä löydettiin KISH-värjäyksessä vastaavalta kohdalta translokaatioita, vaikkakin pienellä prosentuaalisella osuu-

della (2 %). Tutkimuksessa käytetyt keuhkonäytteitten monikudosblokit eivät tuoneet keuhkonäytteitten tarkasteluun toivottua lisähyötyä.

Ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman näytteistä löytyi todella vähän translokaatioita. Tämä selittyy kirjallisuudesta löytyvällä tiedolla, jonka mukaan esimerkiksi EML4-ALK-fuusiogeneesi esiintyy vain 3–8 %:ssa keuhkokarsinomia (Luku 4.2). Vuonna 2011 tehdyssä tutkimuksessa ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman näytteistä löydettiin 4 %:sta ALK-geenimuutos (Luku 7.3). Opinnäytetyötutkimuksessa translokaatioita löytyi vain yhdestä potilasnäytteestä ja yhdestä monikudosblokkien näytteestä todella pienellä prosentuaalisella osuudella (molemmissa 2 %). ALK-mutaatioiden harvinaisuuden vuoksi ei ole ihme, että tutkimuksessa käytetyistä näytteistä ei löytynyt ALK-translokaatioposiitivisuutta. Yhteensä 216 näytteestä löytyi IHK-positiivisuutta vain yhdestä, mikä on 0,46 % kaikista monikudosblokkien näytteistä. Jos lasketaan translokaatioposiitivisten näytteitten määrä kaikista käytetyistä näytteistä, saadaan prosenttiosuudeksi 0,91 %.

Näytemateriaalina ei-pienisoluisen keuhkokarsinooma osoittautui haasteelliseksi, koska keuhkokuoksen rakenne on harvaa ja solut ovat hajallaan ympäri näytettä. Lisäksi näytteissä on keuhkokuoksen seassa muuta materiaalia kuten hiiltä ja limaa. Keuhkon harvasoluisen rakenne ja ALK-proteiinin vähäinen ilmentyminen vaikeuttivat ja hidastivat tulosten analysointia.

**Anaplastinen suurisolulymfooma** Anaplastisen suurisolulymfooman näyteblokkeja oli tutkimuksessa mukana kolme. IHK-menetelmällä värjäytyistä näyteblokeista kaksi oli molemmilla menetelmillä negatiivisia ja yksi molemmilla menetelmillä positiivinen. Positiivinen näyte valittiin KISH-menetelmän optimointiin.

Optimoinnissa käytetty anaplastisen suurisolulymfooman näyte ilmensi kauttaaltaan ALK-proteiinia ja translokaatioita ilmeni samassa suhteessa. Kirjallisuuden mukaan noin 60–85 % anaplastisista suurisolulymfoomista on positiivisia ALK-proteiinin suhteen ja tunnetuin proteiinin ilmentymiseen johtava tekijä on ALK-geenin translokaatio (Luku 4.3). Tämä yksi näyte osoitti hyvin menetelmien vastaavuuden, mutta menetelmien vastaavuuden tarkempi määrittäminen vaatisi suuremman näytemäärän. Värjäyksien perusteella voidaan osoittaa KISH-menetelmän toimivan anaplastisen suurisolulymfooman näytteillä, koska tutkimusnäytteelle saavutetut translokaatiosignaalit olivat erittäin selkeitä. Anaplastisen suurisolulymfooman näytteitten ALK-statuksen määrittäminen on merkittävää, sillä ALK-positiivisten syöpätapausten viiden vuoden ennuste on huomattavasti ALK-negatiivisia parempi (Palmer ym. 2009, 349).

Anaplastisen suurisolulymfooman näyte oli syöpänäytteistä helppotulkintaisin. Syöpätyypin kudoksen rakenne on tiivis verrattuna esimerkiksi keuhkokuoksen rakenteeseen. Lisäksi ALK-proteiinin runsas ilmentyminen ympäri näytettä helpotti tulosten arviointia, koska translokaatioita voitiin etsiä laajalta alueelta. Syöpätyypin helppo tulkittavuus edesauttoi menetelmien vastaavuuden arviointia ja KISH-menetelmän toimivuus oli helppo todeta.

**Follikulaarinen lymfooma** Tutkimuksessa käytettiin viittä follikulaarisen lymfooman näytettä ja yhtä normaalia imusolmukenäytettä. Kaikki viisi syöpänäytettä olivat selvästi positiivisia BCL2-proteiinin ilmentymisen suhteen, joten vaihtoehtoisia IHK-värjäyksiä ei tarvittu. Syöpänäytteet ja normaali imusolmukenäyte värjättiin KISH-menetelmällä.

Kaikissa syöpänäytteissä BCL2-proteiinin ilmentymisen suhteen positiiviset follikkelit olivat translokaatiopositiivisia KISH-menetelmällä. Translokaatiopositiivisuutta ilmeni noin 35–65 % follikkelien soluista. Kirjallisuuden mukaan suurin osa follikulaarisen lymfooman syöpätapauksista on positiivisia BCL2-translokaation (14;18)(q32;q21) suhteen, mikä näkyi tutkimuksessa kaikkien follikulaaristen lymfoomien translokaatiopositiivisuutena (Luku 5.1). Koska BCL2-proteiinin tuoton aiheuttava translokaatio on follikulaarisessa lymfoomassa niin yleinen, voidaan IHK- ja KISH-menetelmien olettaa tämänkin tiedon perusteella vastaavan.

BCL2-positiivisuus oli selvää jokaisen syöpänäytteen kaikissa follikkeleissa, mikä helpotti follikulaarisen lymfooman näytteitten tulkintaa. Follikkeleiden paikantaminen ja translokaatioiden laskeminen KISH-laseilta oli helppoa ja suuri osa follikkelien soluista osoittautui translokaatiopositiivisiksi. Runsas IHK-positiivisuus ja suuri translokaatiopositiivisten solujen osuus osoittivat menetelmien selvän vastaavuuden. Opinnäytetyötutkimuksen perusteella KISH-menetelmän voidaan todeta toimivan BCL2-näytteitten diagnostiikassa ja olevan diagnostisesti hyödynnettävissä. Mutta koska follikulaarisissa lymfoomissa translokaatioita on todettu esiintyvän suurimmassa osassa syöpätapauksista (Luku 5.1), KISH ei ole välttämätön menetelmä tämän syövän diagnosoimiseksi. Muutokset pystytään osoittamaan BCL2-proteiinin tuottona IHK-värjäyksessä.

Follikulaarisessa lymfoomassa kudoksen rakenne oli tulkinnallisesti helppo, koska solut olivat lähekkäin ja näytteistä puuttui keuhkokudokselle ominaiset materiaalit, kuten hiili ja lima. Toisaalta follikulaarisessa lymfoomassa syöpäsolut ovat ryhmittyneet niin tiiviisti, että yksittäisten solujen erottaminen oli osittain vaikeaa, mikä teki laskettavaksi soveltuvan follikkelin löytämisestä hankalaa. Follikulaarisen lymfooman näyte oli helppo tulkita translokaatiopositiiviseksi, mutta tarkan solumäärän laskeminen oli aikaavievää.

### 9.3 Tulosten luotettavuus

**Tutkimusprosessin luotettavuus** Tutkimusprosessin luotettavuutta tukevat käytetty lähdekirjallisuus ja käytetyt menetelmäohjeet, joiden perusteella työ tehtiin. Työn tietopohja pyrittiin kasamaan mahdollisimman tuoretta lähdekirjallisuutta ja uusimpia tieteellisiä artikkeleita käyttäen. Lähdekirjallisuutta käytettäessä tietoa koottiin monesta lähteestä, mikä auttoi kokonaiskuvan hahmottumisessa ja varmisti tiedon paikkaansapitävyyttä. Lähdekirjallisuus koostui, yhtä kirjaa lukuun ottamatta, 2000-luvulla julkaistusta materiaalista ja oli suurelta osin englanninkielistä. KISH-menetelmän optimoitutyö tehtiin esivalidoituja ja validoituja menetelmäohjeita käyttäen. IHK-värjäykset (ALK ja BCL2) olivat validoituja menetelmiä ja rutiinikäytössä KYSin kliinisellä patologialla. KISH-menetelmän testauksessa noudatettiin Dakon esivalidoituja työohjeita.

Tutkimusprosessin onnistumiseen ja luotettavuuteen vaikutti hyvä ennakkovalmistautuminen. Ennen tutkimusta perehdyttiin käytettäviin menetelmiin ja aiempiin tutkimuksiin yhdessä ohjaajan kanssa. Menetelmän testauksessa ensimmäinen KISH-värjäys tehtiin ohjaajan avustuksella, minkä jälkeen opiskelijat suorittivat loput värjäyksistä itsenäisesti. Ongelmatilanteissa käännyttiin ohjaajien tai patologian muun henkilökunnan puoleen. Tutkimustulokset arvioitiin yhdessä opinnäytetyön ohjaajien kanssa.

Opinnäytetyötutkimuksessa KISH osoittautui ongelmaherkäksi menetelmäksi, jolla on huono toistettavuus. Tutkimusprosessin luotettavuuden parantamiseksi ja ongelmien jäljittämiseksi värjäyssarjoissa on suositeltavaa käyttää kontrolleja. Positiivisen kuduskontrollin tarkoituksena on osoittaa esikäsittelyn ja värjäysprosessin onnistuminen sekä oikeiden inkubaatioaikojen ja lämpötilojen käyttö. Negatiivinen kontrolli ei sisällä tutkittavaa antigeeniä ja sen värjäytyminen positiiviseksi voi tarkoittaa esimerkiksi käytetyn vasta-aineen matalaa spesifisyyttä. Jos kontrollinäyte antaa väärän tuloksen, värjäys on epäonnistunut. Värjäyksessä kontrollit voidaan värjätä omalla lasillaan tai samalla lasilla tutkimusnäytteitten kanssa. (Rasmussen 2009, 128.) Kontrollien avulla voidaan jäljittää värjäyksen ongelmakohta, erityisesti jos käytetään kontrolleja jokaisella näytelasilla.

**Tutkimustulosten luotettavuus** Tutkimustulosten arvioimiseksi näytteet valokuvattiin mikroskoipoimisen sijasta. Mikroskoopin valokuvausohjelmalla kuvaamalla varmistettiin, että translokaatioiden tarkastelu tapahtui proteiinia ilmentäviltä alueilta. Kuvaruudulta laskeminen oli nopeampi tapa ja sen avulla voitiin olla varmoja siitä, että solut laskettiin oikealta alueelta eikä samoja soluja laskettu useaan kertaan. Kuvanmuokkausohjelmalla lasketut solut voitiin merkata. Toisaalta mikroskoopilla laskeminen olisi helpottanut yksittäisten solujen erottumista, koska tarkentaminen solurajoihin olisi ollut mahdollista. Tulosten tarkastelu mikroskoopilla olisi voinut johtaa translokaatioiden laskemiseen väärältä alueelta, mikä olisi voinut vääristää IHK- ja KISH-menetelmien vertailua.

Opinnäytetyötutkimuksen arviot menetelmien vastaavuudesta perustuvat todella pieniin näytemääriin, joka tulee muistaa tuloksia tarkastellessa. Paras näytemäärä saavutettiin follikulaarisen lymfooman näytteillä, joita oli viisi. Neuroblastoomanäytteitä oli kolme ja ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman ja anaplastisen suurisolulymfooman näytteitä vain yksi. Suurempi otoskoko olisi parantanut tutkimustulosten luotettavuutta ja menetelmien vastaavuutta olisi voitu tarkastella prosentuaalisesti. Suuremman näytemäärän saavuttaminen näin lyhyellä aikataululla toteutetulle tutkimukselle oli kuitenkin mahdotonta. Suurempi näytemäärä olisi pitkittänyt laboratoriotyövaihetta entisestään. Erityisesti ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman kohdalla suurempi näytemäärä olisi ollut suotavaa, mutta syöpätyypin harvinaisuuden vuoksi potentiaalisia näytteitä ei ollut saatavilla. Tutkimusmateriaalia kerätessä huomattiin, että useat keuhkonäytteet olivat lainattu johonkin muuhun tarkoitukseen.

Optimoinnissa käytetyille näytteille pyrittiin saamaan kolme toistettavaa tulosta, joilla osoitettaisiin yksittäisten tulosten luotettavuus ja lisättäisiin menetelmien vertailun luotettavuutta. Aiemmin kuvattujen kolmen epäonnistuneen värjäyssarjan, ajan puutteen ja reagenssien hupenemisen vuoksi kolmea toistettavaa tulosta ei saavutettu yhdellekään näytteistä. Kaikille viidelle follikulaarisen lymfooman näytteelle onnistuttiin saamaan kaksi toistettavaa tulosta. Kolmesta neuroblastoomanäytteestä

kahdelle näytteelle saatiin kaksi toistettavaa tulosta ja yhdelle yksi tulos. Kahdesta ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman näytteestä toinen hylättiin ja toiselle saatiin vain yksi tulos. Anaplastisen suurisolulymfooman näytteelle onnistuttiin saamaan kaksi toistettavaa tulosta.

KISH-menetelmän optimoinnissa suurimmalle osalle näytteistä saatiin kaksi toistettavaa tulosta. Ainoastaan yksi neuroblastoomanäyte (NBL 1) ja ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman näyte (NSCLC 1) analysoitiin yhden onnistuneen KISH-värjäyksen perusteella. Neuroblastoomanäytteen kohdalla tällä ei ollut niin suurta merkitystä, koska näyte todettiin translokaationegatiiviseksi kuten kaikki muutkin neuroblastoomanäytteet. Keuhkonäytteen kohdalla lisävarmistus translokaatioposiitivisuudesta olisi ollut toivottavaa, sillä kyseinen näyte oli ainut optimoinnissa mukana ollut ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman potilasnäyte eikä monikudosblokeista saavutettu odotettu hyötyä. Ongelmista huolimatta kaikille syöpätyypeille saatiin ainakin yksi KISH-värjäystulos, jossa oli selvästi havaittavissa koettimien signaalit. Tästä syystä menetelmä voitiin todeta toimivaksi eikä lisävärjäyksiä koettu tarpeelliseksi. Samassa värjäyssarjassa analysoiduille näytteille saatiin sekä negatiivisia että positiivisia translokaatiotuloksia, mikä kertoo myös menetelmän toimivuudesta.

Näytetyypeittäin vaihteleva kudusrakenne ja IHK-positiivisuuden laajuus vaikuttivat tulosten luotettavuuteen. Ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman kahdessa translokaatioposiitiivisessa näytteessä ALK-proteiinin tuottoa oli havaittavissa vain muutamassa kymmenessä hajallaan olevassa solussa. Tästä syystä on vaikea arvioida, kuinka hyvin translokaatioita ilmeni näissä samoissa soluissa. Toisin kuin anaplastisen suurisolulymfooman ja follikulaarisen lymfooman näytteissä, joissa ALK-proteiinin suhteen positiivisia soluja oli valtavasti ja translokaatioposiitivisuus ilmeni samassa suhteessa. Follikulaarisen lymfooman tulkintaa helpotti BCL2-proteiinin ilmentyminen tarkkarajaisissa follikkeleissa. Myös neuroblastoomanäytteistä tulkinnan tekeminen oli helppoa, koska ALK-proteiinin ilmeneminen oli runsasta. Näytteistä translokaatioiden puuttuminen oli helppo havaita luotettavasti.

Tutkimusnäytteitten kudusrakenteista johtuen kaikkien näytteitten tuloksia ei arvioitu sadan lasketun solun perusteella. Vähin laskettujen solujen määrä oli follikulaarisen lymfoomanäytteen (FL 4) 74 solua. Muiden näytteitten tulokset arvioitiin vähintään sadan lasketun solun perusteella. Työssä keskityttiin menetelmän toimimiseen diagnoosin tekemisen sijasta, joten geenimuutoksen suhteen positiivisten solujen määrällä ei ollut niin suurta merkitystä. Tärkeintä oli todeta menetelmän toimivuus eri syöpätyypeillä ja havaita translokaatioposiitivisuutta. Translokaatioposiitiivisten solujen arvioiminen oli tarpeellista menetelmien vastaavuuden arvioinnin kannalta. Esimerkiksi ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman kohdalla havaittiin vähäisen IHK-positiivisuuden johtavan vähäiseen translokaatioposiitivisuuteen. Menetelmän voitiin todeta toimivan ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman kohdalla, mutta IHK- ja KISH-menetelmien vastaavuutta ei voitu todeta luotettavasti, kuten edellä todettiin.

Opinnäytetyössä saavutetut tulokset myötäilevät aikaisemmin julkaistujen tutkimusten tuloksia. Opinnäytetyötutkimuksessa IHK- ja KISH-menetelmien vastaavuudesta saatiin osoitus follikulaarisen lymfooman ja anaplastisen suurisolulymfooman näytteillä. Myös ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman kohdalla menetelmien vastaavuudesta saatiin viitteitä. Aiemmissa tutkimuksissa menetelmien on todettu vastaavan ei-pienisoluisen keuhkokarsinooman näytteillä, mikä vahvistaa tässä tutkimuksessa

saavutettua tulosta. Menetelmiä on verrattu myös rintasyövän näytteillä erinomaisin tuloksin. Rintasyöpänäytteillä käytettiin tässäkin opinnäytetyössä käytettyä dual-color-CISH-menetelmää. (Luku 7.3.) Verrattavuus aiempiin tutkimuksiin osoittaa optimointityön onnistuneen.

#### 9.4 Tulosten merkitys

Opinnäytetyöllä saavutettiin tietoa, jota voidaan hyödyntää KYSin klinisen patologian yksikössä. Vaikka KISH-menetelmää ei tämän tutkimuksen perusteella voida ottaa käyttöön, tutkimus osoitti, että menetelmä toimii KYSillä rutiinikäytössä olevilla formaliinifiksoiduilla parafiinileikkeillä. Tutkimustuloksia voidaan käyttää tarvittaessa KISH-menetelmän myöhemmissä testauksissa. Vanhimmat opinnäytetyössä käytetyt näytteet olivat vuodelta 2006, joten opinnäytetyöllä osoitettiin menetelmän toimivuus myös vanhemmilla näytteillä. Näytemateriaalissa solujen DNA on säilynyt, mikä mahdollistaa translokaatiokoettimien käytön. Tämä on KYSin kannalta merkittävä tieto ja kertoo käytössä olevien fiksaatio- ja kudaskäsittelymenetelmien toimivuudesta. Kolmas tärkeä tulos tässä opinnäytetyössä on keuhkonäytteille optimoitu IHK-värjäysprotokolla. Tutkimuksessa käytetty vahvempi ALK-värjäys (Luku 8.1) on opinnäytetyöraportin kirjoittamisen aikana otettu kliniseen käyttöön KYSin patologian laboratoriossa. Tähän mennessä sillä on diagnosoitu ainakin yksi ALK-positiivinen adenokarsinooma, joka rutiinivärjäyksessä osoittautui ALK-negatiiviseksi.

KISH-menetelmällä ei voida korvata IHK-värjäyksiä, vaikka opinnäytetyössä osittain osoitettiin menetelmien vastaavuus. Syöpätautien yleistymisen lisää tarkan syöpädiagnostiikan tarvetta ja toimiesseen KISH tarjoaa mahdollisuuden luokitella syövät geenimuutoksen perusteella alatyyppeihin ja täten joissakin tapauksissa edistää potilaan hoitoa. KISH-menetelmästä hyötyvät eniten niiden syöpätyyppien potilaat, joille voidaan tarjota syövän geenimuutosta vastaan kehitettyjä hoitomuotoja kuten kinaasi-inhibiittorihoitoja (Luku 4). Menetelmä on hyvä lisä IHK-menetelmälle ja sillä voidaan tarkentaa IHK-menetelmällä todetun muuntuneen proteiinin tuoton taustalla piileviä syitä.

Tällä opinnäytetyöllä saavutettua tietoa voidaan hyödyntää KISH-menetelmän testauksen myöhemmissä vaiheissa. Menetelmän käyttöönoton tutkimukset kannattaa tulevaisuudessa keskittää yhteen syöpätyyppiin kerrallaan. Tulevissa tutkimuksissa näytemäärän kasvattaminen lisää tulosten tilastollista merkittävyyttä ja antaa lisää informaatiota menetelmien toimivuudesta. Tutkimukset kannattaa kohdistaa menetelmiin, joiden tuloksella on erityistä kliinistä merkitystä potilaan hoidon kannalta. Eipienisoluisen keuhkokarsinooman kohdalla ongelmana on geenimuutoksen suhteen positiivisten syöpien pieni prosentuaalinen osuus, mikä asettaa haasteita riittävän tutkimusmateriaalin keräämiselle. Toisaalta menetelmän pystyttäminen ja ylläpitäminen harvoin esiintyville syöpätyypeille ei ole taloudellisesti kannattavaa. Tällaisten syöpätyyppien tutkimuksissa kannattaa suosia perinteisiä menetelmiä ja hyödyntää mahdollisesti muualla jo käytössä olevaa diagnostiikkaa.

#### 9.5 Tutkimuksen eettisyys

Opinnäytetyön teossa noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä, jota eettisesti hyvä tutkimus edellyttää. Tutkimuksen asianmukaisuus ja eettisyys edellyttävät tutkijalta muun muassa tiedeyhteisön



tunnustamien toimintatapojen, kuten rehellisyyden ja yleisen huolellisuuden, noudattamista. Lisäksi tutkijan tulee toimia eettisesti kestäviä tiedonhankinta- ja tutkimusmenetelmiä käyttäen sekä käsitellä muiden tutkijoiden töitä asianmukaisesti. Tutkimustyö on asianmukaisesti suunniteltua, toteutettua ja raportoitua. Erityisesti tiedonhankintatavoissa ja tutkimusjärjestelyissä on otettava huomioon eettiset näkökohdat. Tutkimustyön kaikissa vaiheissa tulee välttää erityisesti toisten tekstien plagioimista ja harhaanjohtavaa tai puutteellista raportointia. (Hirsjärvi ym. 2009, 23–26.)

Kaikissa tutkimuksissa lähtökohtana tulee olla ihmisarvon kunnioittaminen. Tämä tarkoittaa ihmisten itsemääräämisoikeutta, jota tutkimuksissa pyritään kunnioittamaan antamalla ihmisille mahdollisuus päättää tutkimukseen osallistumisesta. Tutkimuksen tekijöiden tulee selvittää, miten henkilöiden suostumus on hankittu, millaisia tietoja heille tutkimuksesta annetaan ja mitä riskejä heidän osallistumiseensa sisältyy. (Hirsjärvi ym. 2009, 25.) Tämän opinnäytetyön eettiset näkökohdat liittyvät näyttemateriaalin käyttöön, sillä käytetty näyttemateriaali koostui oikeista potilasnäytteistä. Tutkimusta varten allekirjoitettiin tutkimuslupa (LIITE 13), joka mahdollisti potilasnäytteiden käytön, ja jossa allekirjoittaneet sitoutuvat noudattamaan salassapito- ja vaitiolovelvollisuutta. Tutkimusvaiheessa potilasnäytteitä käsiteltiin virallisia näytenumeroita käyttäen, mutta missään vaiheessa työtä potilaiden nimiä ja muita henkilötietoja ei käsitelty. Raporttiin näytteet merkittiin vain syöpätyyppejä ja järjestysnumeroa käyttäen yksilönsuojan säilyttämiseksi edelleen.

## 9.6 Ammatillinen kasvu

Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman opintosuunnitelman (2010) mukaan valmistuva bioanalyttikko osaa hankkia ja käsitellä oman alansa tietoa sekä kykenee kriittiseen tiedon arviointiin ja kokonaisuuksien hahmottamiseen. Lisäksi opiskelija osaa hyödyntää näyttöön perustuvaa tutkimustietoa terveysalan laboratoriopalvelutuotantoprosesseissa (Savonia-ammattikorkeakoulu 2010). Opinnäytetyön tekeminen opetti teoriatietoa syövän synnystä, syöpädiagnostiikasta ja käytetyistä syöpädiagnostisista menetelmistä. Koska työn perusta on hyvin teoriapainotteinen, jouduttiin raportin kirjoittamisessa käyttämään useita eri lähteitä ja yhdistämään niistä suurempia kokonaisuuksia. Saatavilla olevan tiedon runsauden vuoksi lähteistä oli osattava eritellä tutkimuksen kannalta oleellinen tieto ja soveltaa sitä tutkimuksen teossa ja tutkimustulosten arvioinnissa. Tutkimusprosessin tiedonhakuvaihe opetti tiedonhaun periaatteet ja kriittistä tiedon arviointia. Opinnäytetyöprosessissa työskentely opetti tieteellisen tiedon hyödyntämistä ja analyttistä tulosten tarkastelua aiempien tutkimustulosten valossa. Suomenkielisen materiaalin vähyyden vuoksi opinnäytetyössä käytettiin suurimmaksi osaksi englanninkielisiä lehtiartikkeleita ja englanninkielistä kirjallisuutta, mikä edisti englannin kielen taitoa sekä kykyä sisäistää ja referoida vieraskielistä tekstiä. Laboratorioalan kansainvälistyessä englannin kielen taito on työelämässä välttämätön.

Opintosuunnitelman (2010) mukaan bioanalyttikon tulee tuntee tutkimus- ja kehittämistoiminnan perusteet ja menetelmät sekä osata toteuttaa pienimuotoisia tutkimus- ja kehittämishankkeita soveltaen alan olemassa olevaa tietoa. Tutkimustoimintaan liittyen bioanalyttikon osaamistavoitteisiin kuuluu kyky suunnitella, organisoida ja kehittää omaa toimintaansa monitahoisesti sekä kyky toimia työyhteisön kehittäjänä ja ratkaista ongelmia (Savonia-ammattikorkeakoulu 2010). Opinnäytetyö-

prosessin aikana työskentely vaati suunnitelmallista ja hyvin organisoitua työskentelyä käytettävissä olevan ajan optimoimiseksi ja hyvien tulosten saavuttamiseksi. Tehty opinnäytetyö vastasi opintosuunnitelman osaamistavoitteeseen pienimuotoisten tutkimus- ja kehittämishankkeitten toteuttamisesta alan olemassa olevaa tietoa hyödyntäen. Ongelmanratkaisukyky kehittyi menetelmän optimointityössä ja tulosten tarkastelussa. Opinnäytetyö liittyi menetelmän validointiin, joten sen myötä menetelmän testauksen peruseriaatteen selkenivät. Kaikki kuvatut oppimistavoitteet ovat hyödyllisiä bioanalyttikon ammatissa, jossa asioiden priorisointi ja suunnitelmallisuus ovat välttämättömiä luotettavien analyysien suorittamiseksi.

Laboratorioprosessien hallinta on bioanalyttikon ammattipätevyyden perusta (Savonia-ammattikorkeakoulu 2010). Opinnäytetyössä perehdyttiin tarkasti histologisen näytteen laboratoriotutkimusprosessiin, immunohistokemiallisiin värjäyksiin ja in situ hybridisaatio -menetelmiin, mikä vahvisti patologian laboratoriotutkimusprosessin osaamista. Koska hybridisaatiomenetelmiä ja anti-geeni-vasta-ainereaktiota käytetään monissa analyysimenetelmissä muillakin laboratorion erikoisaloilla, voidaan opittua tietoa hyödyntää laaja-alaisesti. Teoriatiedon lisäksi käytännön ote ja omaaloitteisuus laboratoriotyöskentelyssä vahvistuivat. Teoriatiedon karttuminen ja käytännön osaamisen vahvistuminen edistävät työelämään siirtymistä tulevaisuudessa.

Opinnäytetyö oli työelämläheinen kahdella tapaa. Opinnäytetyön aiheen ja tavoitteiden vastaaminen suoraan työelämlän tarpeeseen ja tutkimustulosten säilyminen työyksikössä tekivät työstä työelämlähtöisen. Opinnäytetyön tekeminen oikeassa työyhteisössä opinnäytetyön ohjaajien ja patologian laboratoriohenkilöstön kanssa edisti kykyä työskennellä työyhteisössä, mikä on yksi valmistuvan bioanalyttikon osaamistavoitteista (Savonia-ammattikorkeakoulu 2010).

## LÄHTEET

- American Cancer Society. 2011. *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition* [verkkolähde]. [viitattu 23.9.2013]. Saatavissa: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>
- Auvinen, E. & Vaheri, A. 2003. Kasvainvirukset. Teoksessa Huovinen P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri A. & Valtonen, V. (toim.). *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 588–600.
- Bang, Y-J. 2012. Treatment of ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* [verkkolehti]. 2012 (10), 1201–1204 [viitattu 22.9.2013]. Saatavissa: [http://www.archivesofpathology.org/doi/abs/10.5858/arpa.2012-0246-RA?url\\_ver=Z39.882003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed&](http://www.archivesofpathology.org/doi/abs/10.5858/arpa.2012-0246-RA?url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&)
- Boenisch, T. 2006. Basic Entzymology. Teoksessa Key, M. (toim.). *Dako Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition*. Carpinteria, CA: Dako, 19 - 25.
- Boenisch, T. 2009a. Antibodies. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 1–9 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications-/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications-/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)
- Boenisch, T. 2009b. Basic Entzymology. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 15 – 19 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)
- Böhm, J. & Kosma, V-M. 2013. Kudosten normaali homeostaasi ja uusiutuminen. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)
- Campbell, M. K. 1995. *Biochemistry*. USA: Saunders College Publishing.
- Carton, J., Daly, R. & Ramani, P. 2007. *Clinical Pathology*. Oxford, UK: Oxford University Press Inc.
- Dako. 2007. *Target Retrieval Solution, pH 9*. Dako Denmark A/S [verkkolähde]. [viitattu 26.10.2013]. Saatavissa: [www.dako.com/fi/download.pdf?objectid=104969003](http://www.dako.com/fi/download.pdf?objectid=104969003)
- Dako. 2011a. *ALK FISH DNA Probe, Split Signal Code Y5417*. Dako An Agilent Technologies Company [verkkolähde]. [viitattu 19.9.2013]. Saatavissa: <http://www.dako.com.cn/download.pdf?>

objectid=114263003

Dako. 2011b. *BCL2 FISH DNA Probe, Split Signal Code Y5407*. Dako An Agilent Technologies Company [verkkolähde]. [viitattu: 19.9.2013]. Saatavissa: <http://www.dako.com/download.pdf?>

objectid=111747004

Dako. 2012a. *Histology FISH Accessory Kit Code K5799*. Dako Academy. 2. painos. Menetelmäohje.

Dako. 2012b. *Dako DuoCISH™ Code SK108*. Dako Academy. 2. painos. Menetelmäohje.

Delsol, G., Ralfkiaer, E., Stein, G., Wright, D. & Jaffe, E. S. 2001. Anaplastic large cell lymphoma. Teoksessa Jaffe, E. S., Harris, N. E., Stein, H. & Vardiman, J. W. (toim.). *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC, 230–235.

Delves, P. J., Martin, S., Burton, D. R. & Roitt, I. M. 2006. *Roitt's Essential Immunology 11th edition*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Dewson, G. & Kluck, R.M. 2010. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton* [verkkolehti]. 2010 9–22 [viitattu 20.8.2013]. Saatavissa: <http://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=6040>

Farmilo, A. J. & Stead, R. H. 2006. Fixation and Processing. Teoksessa Key, M. (toim.). *Dako Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition*. Carpinteria, CA: Dako, 27–33.

Farmilo, A. J. & Stead, R. H. 2009. Fixation and Processing. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 29–33 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)

Franssila, K. 2007. Syövän patologia. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. J., Teppo, L. & Tenhunen, M. (toim.). *Syöpätaudit*. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 82–94.

Galteland, E., Sivertsen, EA., Svendsrud, DH., Smedshammer, L., Kresse, SH., Meza-Zepeda, LH., Myklebost, O., Suo, Z., Mu, D., DeAngelis, PM. & Stokke, T. 2005. Translocation t(14;18) and gain of chromosome 18/BCL2: effects on BCL2 expression and apoptosis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* [verkkolehti]. 2009 (15) 2313–2323 [viitattu 21.9.2013]. Saatavissa: <http://www.nature.com/leu/journal/v19/n12/full/2403954a.html>

Georgescui, A., Stoicea, M., Comănescu, M., Dobrea, C., Andrei, F., Neagu, M., Cionca, F., Ciobanu, A., Lupu, A & Ardeleanu, C. 2010. Prognostic and predictive significance of the bcl-2/IgH transloca-

tion in malignant follicular lymphomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* [verkkolehti]. 2010 (4) 687–691 [viitattu 21.9.2013]. Saatavissa: <http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/510410687691.pdf>

Hallberg, B. & Palmer, R.H. 2011. ALK and NSCLC: Targeted therapy with ALK inhibitors. *F1000 Medicine Reports* [verkkolehti]. 2011 (21) [viitattu 22.9.2013]. Saatavissa: <http://f1000.com/prime/reports/m/3/21/>

Harris, N. L. 2001. Mature B-Cell neoplasms: Introduction. Teoksessa Jaffe, E. S., Harris, N. E., Stein, H. & Vardiman, J. W. (toim.). *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC, 121–126.

Harvey, R. & Schönau, A. 2006. Teoksessa Key, M. (toim.). *Dako Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition*. Carpinteria, CA: Dako, 89–94.

Henriksen, U., Müller, S. & Schönau, A. 2009. Dual Color CISH and FISH to CISH Conversion. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 97–101 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistohemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistohemical_staining_methods.htm)

Heukamp, L. C., Thor, T. Schramm, A., De Preter, K., Kumps, C., De Wilde, B., Odersky, A., Peifer, M., Lindner, S., Spruessel, A., Pattyn, F., Mestdagh, P., Menten, B., Kuhfittig-Kulle, S., Künkele, A., König, K., Meder, L., Chatterjee, S., Ullrich, R. T., Schulte, S., Vandesompele, J., Speleman, F., Büttner, R., Eggert, A. & Schulte, J. H. 2012. Targeted Expression of Mutated ALK Induces Neuroblastoma in Transgenic Mice. *Science Translational Medicine* [verkkolehti]. 2012 (141) 1–9 [viitattu 20.10.2013]. Saatavissa: <http://stm.sciencemag.org/content/4/141/141ra91.abstract>

Hirsjärvi, R., Remes, P. & Sajavaara P. 2009. *Tutki ja kirjoita*. 15. painos. Helsinki: Tammi.

Hoff, K., Jörgensen, J.T., Müller, S., Røngaard, E., Rasmussen, O. & Schönau, A. 2010. Visualization of FISH Probes by Dual-Color Chromogenic In Situ Hybridization. *American Journal of Clinical Pathology* [verkkolehti]. 2010 (133) 205–211 [viitattu 28.9.2013]. Saatavissa: <http://ajcp.ascpjournals.org/content/133/2/205.full>

IAP, International Academy of Pathology. 2012. *Patologian laboratorion toimintajärjestelmä*. Versio 4.2.4. International Academy of Pathology. Suomen osasto. Laadunvarmistusryhmä [viitattu 6.10.2013]. Saatavissa: <http://www.labquality.org/LQ/pdf.aspx?dir=3&path=Qualitor/Iaplkohj%202012%20424.pdf>

Isola, J. & Tanner, M. 2004. Chromogenic in situ Hybridisation in Tumor Pathology. Teoksessa Roulston, J. E. & Bartlett, J. M. (toim.). *Methods in Molecular Medicine - Molecular Diagnosis of Cancer* [verkkolähde]. [viitattu 19.1.2013]. Saatavissa: [http://youth.pumch.cn/sites/default/files/sharefile/423/2010/08/\\_pdf\\_5594c.pdf](http://youth.pumch.cn/sites/default/files/sharefile/423/2010/08/_pdf_5594c.pdf)

Isola, J. 2007. Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. J., Teppo, L. & Tenhunen, M. (toim.). *Syöpätaudit*. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 16–33.

Key, M. 2009. Immunohistochemistry Staining Methods. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 57–60 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)

Kiernan, J. A. 2008. *Histological and histochemical methods, Theory and practice*. 4. painos. Oxford: Scion Publishing Ltd.

Kim, H., Yoo, S-B., Choe, J-Y., Paik, J. H., Xu, X., Nitta, H., Zhang, W., Grogan, T., Lee, C-T., Jheon, S. & Chung, J-H. 2011. Detection of ALK Gene Rearrangement in Non-small Cell Lung Cancer - A Comparison of Fluorescence in Situ Hybridization and Chromogenic In Situ Hybridization with Correlation of ALK Protein Expression. *Journal of Thoracic Oncology* [verkkolehti]. 2011 (8) 1359–1366 [viitattu 24.9.2013]. Saatavissa: <http://journals.lww.com/jto/pages/articleviewer.aspx?year=2011&issue=08000&article=00009&type=abstract>

Knuutila, A. & Salmenkivi, K. 2012. Keuhkosyövän uudet hoidot edellyttävät tarkentunutta diagnostiikkaa. *Duodecim*. 2012 (128) 2187–2189.

Knuutila, S. 2012a. Syto- ja molekyylogeneettiset menetelmät. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Knuutila, S. 2012b. Perinteinen kromosomitutkimus eli sytogeneettinen tutkimus. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Kumar, G. L. & Rudbeck, L. 2009. Demasking of Antigens. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 51–56 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)

Lappi-Blanco, E., Mäkinen, J.M., Jartti, A., Mali, P. & Kaarteenaho, R. 2012. Keuhkosyöpien tarkentuva diagnostiikka. *Duodecim*. 2012 (128) 2225–2235.

Lamant, L., Pulford, K., Bischof, D., Morris, S.W., Mason, D.Y., Delsol, G. & Mariame, B. 2000. Expression of the ALK Tyrosine Kinase Gene in Neuroblastoma. *American Journal of Pathology* [verkkolehti]. 2005 (5) 1711–1721 [viitattu 23.9.2013]. Saatavissa: [http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/ajpa/article/S0002-9440\(10\)65042-0/abstract](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/ajpa/article/S0002-9440(10)65042-0/abstract)

Lehto, V-P & Stenbäck, F. 2012a. Normaali solu: proto-onkogeeneit ja onkogeeneit. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Lehto, V-P. & Stenbäck, F. 2012b. Kemialliset karsinogeenit. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Lehto, V-P. & Stenbäck, F. 2012c. Perinnölliset ja sporadisiet syövät. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Lehto, V-P & Stenbäck, F. 2012d. Syöpä väestötasolla. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Lehto, V-P & Stenbäck, F. 2012e. Poikkeava kromosomimäärä ja kromosomien rakennehäiriöt. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Macdonald, F., Ford, C. H. J. & Casson, A. G. 2004. *Molecular Biology of Cancer*. 2. painos. Lontoo: BIOS Scientific Publishers.

Nadji, M. 2006. Molecular-Friendly Tissue Processing. Teoksessa Teoksessa Key, M. (toim.). *Dako Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition*. Carpinteria, CA: Dako, 35–40.

National Cancer Institute. 2013. *General Information About Neuroblastoma* [verkkosivu]. [viitattu 16.9.2013]. Saatavissa: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/neuroblastoma/Health-Professional/page1>

Mali, P., Ojala, A. & Salo, J. A. 2007. Keuhkosyöpä. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. J., Teppo, L. & Tenhunen, M. (toim.). *Syöpätaudit*. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 277–294.

Mayr, D., Heim, S., Weyrauch, K., Zeindl-Eberhart, E., Kunz, A., Engel, J. & Kircher, T. 2009. Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Histopathology* [verkkolehti]. 2009 (55) 716–723 [viitattu 24.9.2013]. Saatavissa: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2559.2009.03427.x/full>

McLeer-Florin, A., Moro-Sibilot, D., Melis, A., Salameire, D., Lefebvre, C., Ceccalli, F., de Fraipont, F., Brambilla, E. & Lantuejoul, S. 2012. Dual IHC and FISH Testing for ALK Gene Rearrangement in Lung Adenocarcinomas in a Routine Practice. A French Study. *Journal of Thoracic Oncology* [verkkolehti]. 2012 (2) 348–354 [viitattu 24.9.2013]. Saatavissa: <http://journals.lww.com/jto/pages/articleviewer.aspx?year=2012&issue=02000&article=00012&type=abstract>

Mäkinen, M. ja Stenbäck, F. 2012. Immunohistokemia. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi-/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi-/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Mäkinen, M. 2012. Histopatologia. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf-04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf-04515&p_selaus=24602)

Müller, S., Matthiesen, S. & Nielsen, K. V. Preparation of FFPE Tissue Slides for Solid Tumor FISH Analysis. 2009. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 67–73 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)

Nathwani, B. N., Harris, N. L., Weisenburger, D., Isaacson, P. G., Piris, M. A., Berger, F., Müller-Hermelink, H. K. & Swerdlow, S. H. 2001. Follikular lymphoma. Teoksessa Jaffe, E. S., Harris, N. E., Stein, H. & Vardiman, J. W. (toim.). *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC, 162–167.

Novocastra™. 2008. Novocastra Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody p80 (Anaplastic Lymphoma Kinase) Product Code: NCL-ALK. Käyttöohje.



Pace, G. E. 2009. Fixation and Processing. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 29–33 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)

Paik, J.H., Choe, G., Kim, H., Choe, J-Y., Lee, H.J., Lee, C-T., Lee, J.S., Jheon, S. & Chung, J-H 2011. Screening of Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangement by Immunohistochemistry in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* [verkkolehti]. 2011 (6) 466–472 [viitattu 21.4.2013]. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21258247>

Palmer, M.H., Verneris, E., Grabbe, C., & Hallberg, B. 2009. Anaplastic lymphoma kinase: signaling in development and disease. *Biochemical Journal* [verkkolehti]. 2009 (420) 345–361 [viitattu 21.4.2013]. Saatavissa: <http://www.biochemj.org/bj/420/bj4200345.htm>

Ramos-Vara, J. A. 2005. Technical Aspects of Immunocytochemistry. *Veterinary Pathology* [verkkolehti]. 2005 (4) 405–424 [viitattu 21.10.2013]. Saatavissa: [vet.sagepub.com/content/42/4/405.full.pdf](http://vet.sagepub.com/content/42/4/405.full.pdf)

Rasmussen, O. F. 2009. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 67–73 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm)

van Rijk, A., Svenstrup-Poulsen, T., Jones, M., Cabeçadas, J., Cigudosa, J.C., Leoncini, L., Mottok, A., Copie Bergman, C., Pouliou, E., Hamilton Dutoit, S. & van Krieken H.J. 2010. Double-staining chromogenic in situ hybridization as a useful alternative to split-signal fluorescence in situ hybridization in lymphoma diagnostics. *Haematologica* [verkkolehti]. 2010 95(2) 247 - 251 [viitattu 16.5.2013]. Saatavissa: <http://europepmc.org/abstract/MED/19773267/reload=0;jsessionid=tST7YgHNmWvKwODmsm2.14>

van Rijk, A., Mason, D., Jones, M., Cabeçadas, J., Crespo, M., Cigudosa, J.C., Garcia, J.F., Leoncini, L., Cocco, M., Hansmann, M-L., Mottok, A., Copie Bergman, C., Baia, M., Anagnostou, D., Pouliou, E., Hamilton Dutoit, S., Hjøllund Christiansen, M., Svenstrup Poulsen, T., & Hauge Matthiesen, S., van Dongen, J. & van Krieken, J.H. 2008. Translocation detection in lymphoma diagnosis by split-signal FISH: a standardised approach. *Journal of Hematology* [verkkolehti]. 2008 (1) 119–126 [viitattu 18.5.2013]. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713488/>

Ristimäki, A., Franssila, K. & Kosma V-M. 2012. Kasvainten histologinen diagnostiikka. Teoksessa Mäkinen, M., Carpen O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.). *Patologia* [verkkokirja]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim [viitattu 4.8.2013]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04515&p\\_selaus=24602](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04515&p_selaus=24602)

Rodig, S.J., Mino-Kenudson, M., Dacic, S., Yeap, B.Y., Shaw, A., Barletta, J.A., Stubbs, H., Law, K., Lindeman, N., Mark, E., Janne, P.A., Lynch, T., Johnson, B.E., Iafrate, A.J. & Chirieac, L.R. 2009. Unique Clinicopathologic Features Characterize ALK-Rearranged Lung Adenocarcinoma in the Western Population. *Clinical Cancer Research* [verkkolehti]. 2009 (15) 5216–5213 [viitattu 10.9.2013]. Saatavissa: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/16/5216.full.pdf+html>

Savonia-ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opintosuunnitelma. Syksy 2010 [verkkosivu]. [viitattu 30.9.2013]. Saatavissa: <http://portal.savonia.fi/amk/fi/opiskelijalle/-opetussuunnitelmat?konr=2410&ojnr=32226&yks=KS&tab=6>

Saxena, R. & Badve S. 2009. Tissue Microarray - Construction and Quality Assurance. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.). *Dako Education Guide Immunohistocal Staining Methods Fifth Edition* [verkkokirja]. Carpinteria, CA: Dako, 43–50 [viitattu 1.8.2013]. Saatavissa: [http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistoc hemical\\_staining\\_methods.htm](http://www.dako.com/fi/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistoc hemical_staining_methods.htm)

Seppälä, I. J. T. 2003. Vasta-aineet eli immunoglobuliinit. Teoksessa Huovinen P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri A. & Valtonen, V. (toim.). *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus-yhtiö Oy Duodecim, 624–635.

Solunetti. 2006. *Imusolmukkeen hyperplasia (hyperplasia follicularis lymphonoid) 40x* [verkkosivu]. [viitattu 27.9.2013]. Saatavissa: [http://www.solunetti.fi/fi/patologia/hyperplasia\\_40x/](http://www.solunetti.fi/fi/patologia/hyperplasia_40x/)

Teerenhovi, L., Franssila, K., Lehtinen, T. & Jyrkkiö, S. 2007. Non-Hodgkin-lymfoomat. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. J., Teppo, L. & Tenhunen, M. (toim.). *Syöpätaudit*. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 607–638.

Thunnissen, E., Bubendorf, L., Dietel, M., Elmberger, G., Kerr, K., Lopez-Rios, F., Moch, H., Olszewski, W., Pauwels, P., Penault-Llorca, F. & Rossi, G. 2012. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Archiv - The European Journal of Pathology* [verkkolehti]. 2012 (461) 245–257 [viitattu 21.4.2013]. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3432214/>

Ventana. 2011. anti-bcl-2 (SP66) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Käyttöohje.

Weyhenmeyer, B., Murphy, A.C., Prehn, J.H.M., Murphy, B.M. 2012. TARGETING THE ANTI-APOPTOTIC BCL-2 FAMILY MEMBERS FOR THE TREATMENT OF CANCER. *Experimental Oncology* [verkkolehti]. 2012 (3) 192–199 [viitattu 20.9.2013]. Saatavissa: <http://exponcology.com.ua/article/3459>

Yang. P-C. 2012 *Techniques to diagnose ALK-translocation* [verkkolähde]. [viitattu 27.9.2013]. Saatavissa: [http://www.itocd.com/fileadmin/presentations2012/120914\\_1530\\_Yang.pdf](http://www.itocd.com/fileadmin/presentations2012/120914_1530_Yang.pdf)

## LIITE 1: NOVOCASTRA ALK-VASTA-AINE

## Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody p80 (Anaplastic Lymphoma Kinase)

**Product Code: NCL-ALK**

### Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

NCL-ALK is intended for the qualitative identification by light microscopy of p80 (Anaplastic Lymphoma Kinase) molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

### Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

### Clone

5A4

### Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to a region which spans the tyrosine kinase catalytic domain and part of the the C-terminus of the NPM-ALK transcript (419-520aa).

### Specificity

Human p80 protein, a hybrid of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene and the nucleophosmin (NPM) gene resulting in the t(2;5) (p23;q35) translocation found in a third of large cell lymphomas.

### Reagent Composition

NCL-ALK is a lyophilized tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative. The user is required to reconstitute the contents of the vial with the correct volume of sterile distilled water as indicated on the vial label.

### Ig class

IgG1

### Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

### Antibody Concentration

Greater than or equal to 45.0 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

### Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:100 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

### Storage and Stability

Store unopened antibody at 2–8 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. Do not use after expiration date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 2–8 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the reconstituted antibody are stored frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use. Return to 2–8 °C immediately after use. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

### Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

### Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.<sup>1</sup> Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

## Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

## Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.<sup>2</sup>

Recommended positive control tissue is a proportion of anaplastic large cell lymphomas.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

## Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody.

Recommended negative control tissue is muscle.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.<sup>3</sup> False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

## Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

## Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-ALK last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

## Results Expected

### Normal Tissues

Clone 5A4 produced no staining in a variety of normal tissues evaluated (n=110).

### Abnormal Tissues

Clone 5A4 produced staining in the cytoplasm and/or nucleus of 3/7 anaplastic large cell lymphomas. No staining was seen in a wide range of additional tumors evaluated (n=148).

**NCL-ALK is recommended for the detection of p80 in anaplastic large cell lymphomas.**

## General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artefacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.<sup>4</sup>

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

## Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Downing JR, Shurtleff SA, Zielenska M, et al. Molecular Detection of the (2;5) translocation of non-Hodgkin's lymphoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Blood. 1995; 85(12):3416-3422.



## Immunohistochemistry methodology for using Novocastra™ antibodies on paraffin-embedded tissue utilizing the high temperature antigen retrieval technique with ABC technique.

### A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 0.5% v/v hydrogen peroxide.
3. 50 mM Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6.
4. Antigen retrieval solution(s) - see Recommendations on Use.
5. Antibody diluent - optimally diluted normal serum.
6. Normal sera from the species in which the secondary antibody is raised.
7. Secondary biotinylated antibody - prepare as recommended by manufacturer.
8. Avidin/Biotin Complex-Horseradish peroxidase (ABC-HRP) - prepare as recommended by manufacturer.
9. 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) - prepare as recommended by manufacturer.
10. Hematoxylin counterstain - prepare as recommended by manufacturer.
11. Mounting medium - use as recommended by manufacturer.

### B. Equipment required but not supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. Stainless Steel Pressure cooker (Novocastra™ recommends that the gaskets are changed at regular intervals to maintain optimum unmasking conditions).
3. General immunohistochemistry laboratory equipment.

### Safety Note

To ensure the correct and safe use of your pressure cooker, PLEASE READ THE MANUFACTURER'S INSTRUCTIONS.

### C. Antigen retrieval solutions (see Recommendations on Use)

#### 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0)

Add 3.84 grams Citric acid (anhydrous) to 1.8 L distilled water. Adjust to pH 6.0 using 1 M NaOH. Make up to 2 L with distilled water.

#### 1 mM EDTA retrieval solution (pH 8.0)

Add 0.37 g EDTA (SIGMA product code E-5134) to 1 L of distilled water. Adjust pH to 8.0 using 0.1 M NaOH.

#### 20 mM Tris/0.65 mM EDTA/0.0005% Tween 20 retrieval solution (pH 9.0)

Dissolve 14.4 g Tris (BDH product code 271197K) and 1.44 g EDTA (SIGMA product code E-5134) in 0.55 L distilled water. Adjust pH to 9 with 1 M HCl and add 0.3 mL Tween 20 (SIGMA product code P-1379). Make up to 0.6 L with distilled water. This is a 10x concentrate which should be diluted with distilled water as required (eg 0.15 L diluted with 1.35 L distilled water).

### D. Methodology

Prior to undertaking this methodology, users must be trained in immunohistochemical techniques.

Customers should determine optimal dilutions for antibodies. Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25 °C).

1. Cut and mount sections on slides coated with a suitable tissue adhesive.
2. De-paraffinize sections in xylene or xylene substitutes.
3. Re-hydrate through graded alcohols.
4. Neutralize endogenous peroxidase using 0.5% v/v hydrogen peroxide/methanol for 10 minutes.
5. Wash slides in running tap water.

Pretreat the sections as follows:

6. Heat 1.5 L of the recommended retrieval solution (see Recommendations on Use) until boiling in a pressure cooker. Cover but do not lock lid. Position slides into metal staining racks (do not place slides close together as uneven staining may occur) and lower into pressure cooker ensuring slides are completely immersed in retrieval solution. Lock lid. When the pressure cooker reaches operating temperature and pressure, time for 1 minute (unless otherwise indicated in Recommendations on Use). Remove pressure cooker from heat source and run under cold water with lid on. DO NOT OPEN LID UNTIL THE INDICATORS SHOW THAT PRESSURE HAS BEEN RELEASED. Open lid, remove slides and place immediately in cool tap water.
7. Wash sections in TBS for 1 x 5 minutes with gentle rocking.
8. Cover sections with diluted normal serum for 10 minutes.
9. Incubate sections with optimally diluted primary antibody (see Recommendations on Use).
10. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
11. Incubate sections in appropriate biotinylated secondary antibody.
12. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
13. Incubate slides in ABC-HRP.
14. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
15. Incubate slides in DAB.
16. Rinse slides in water.
17. Counterstain with hematoxylin.
18. Dehydrate, clear and mount sections.

### E. Amendments to Previous Issue

Amendments have been made to layout only. No text has been altered from the previous issue.

### F. Date of Issue

4 February 2008 (CEprotocol/HTAUT).

## LIITE 2: VENTANA BCL2-VASTA-AINE



## anti-bcl-2 (SP66) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4604

06446329001

IVD 50



Figure 1. Anti-bcl-2 (SP66) cytoplasmic staining of lymphoma tissue.

This product should be interpreted by a qualified pathologist in conjunction with histological examination, relevant clinical information, and proper controls.

This antibody is intended for *in vitro* diagnostic (IVD) use.

## INTENDED USE

Anti-bcl-2 (SP66) Rabbit Monoclonal Primary Antibody is directed against human bcl-2 expressed by B-cells of the mantle zone and interfollicular T cells. This antibody exhibits a cytoplasmic staining pattern and may be used to aid in the identification of follicular lymphomas and diffuse large cell lymphomas. The antibody is intended for qualitative staining in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Anti-bcl-2 (SP66) is a rabbit monoclonal antibody produced against the bcl-2 oncoprotein.

The bcl-2 oncoprotein plays a central role in apoptosis, serving as an inhibitor of the apoptotic process, and it has given name to a family of proteins engaged in the promotion/inhibition of apoptosis.<sup>1</sup> Bcl-2 proved to block programmed cell death rather than promote proliferation. Bcl-2 expression is inhibited in germinal centers where apoptosis forms part of the B-cell developmental pathway. Bcl-2 can serve to distinguish follicular hyperplasia from follicular lymphoma. Reactive follicles show no staining for bcl-2, while the cells in neoplastic follicles exhibit membrane and/or cytoplasmic staining. Anti-bcl-2 has found numerous applications in studies of apoptosis, e.g., in hematological malignancies and other malignant diseases.<sup>2,3</sup>

## REAGENT PROVIDED

Anti-bcl-2 (SP66) contains sufficient reagent for 50 tests.

One 5 mL dispenser of anti-bcl-2 (SP66) contains approximately 1.2 µg of a rabbit monoclonal antibody.

The antibody is diluted in 0.05M Tris-HCl with 1% carrier protein, and 0.10% ProClin 300, a preservative.

Total protein concentration of the reagent is approximately 10 mg/mL. Specific antibody concentration is approximately 0.23 µg/mL. There is no known non-specific antibody reactivity observed in this product.

Anti-bcl-2 (SP66) is a recombinant rabbit monoclonal antibody produced as purified cell culture supernatant.

Refer to the appropriate VENTANA detection kit package insert for detailed descriptions of: (1) Principles of the Procedure, (2) Materials and Reagents Needed but Not Provided, (3) Specimen Collection and Preparation for Analysis, (4) Quality Control Procedures, (5) Troubleshooting, (6) Interpretation of Results, and (7) General Limitations.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Staining reagents, such as VENTANA detection kits and ancillary components, including negative and positive tissue control slides, are not provided.

## STORAGE

Store at 2-8°C. Do not freeze.

To ensure proper reagent delivery and the stability of the antibody, replace the dispenser cap after every use and immediately place the dispenser in the refrigerator in an upright position.

Every antibody dispenser expiration dated. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use reagent beyond the expiration date.

## SPECIMEN PREPARATION

Routinely processed, formalin-fixed, paraffin-embedded tissues are suitable for use with this primary antibody when used with VENTANA detection kits and VENTANA BenchMark XT and BenchMark ULTRA automated slide stainers. The recommended tissue fixative is 10% neutral buffered formalin.<sup>6</sup> Slides should be stained immediately, as antigenicity of cut tissue sections may diminish over time.

It is recommended that positive and negative controls be run simultaneously with unknown specimens.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic (IVD) use.
2. ProClin 300 is used as a preservative in this solution. It is classified as an irritant and may cause sensitization through skin contact. Take reasonable precautions when handling. Avoid contact of reagents with eyes, skin, and mucous membranes. Use protective clothing and gloves.
3. Materials of human or animal origin should be handled as biohazardous materials and disposed of with proper precautions.
4. Avoid contact of reagents with eyes and mucous membranes. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
5. Avoid microbial contamination of reagents as it may cause incorrect results.
6. Consult local and/or state authorities with regard to recommended method of disposal.
7. For supplementary safety information, refer to the product Safety Data Sheet and the Symbol and Risk Phrase Guide located at [www.ventana.com](http://www.ventana.com).

## STAINING PROCEDURE

VENTANA primary antibodies have been developed for use on VENTANA BenchMark XT and BenchMark ULTRA automated slide stainers in combination with VENTANA detection kits and accessories. Refer to Table 1, Table 2, and Table 3 for recommended staining protocols.

This antibody has been optimized for specific incubation times but the user must validate results obtained with this reagent.

The parameters for the automated procedures can be displayed, printed and edited according to the procedure in the instrument Operator's Manual. Refer to the appropriate VENTANA detection kit package insert for more details regarding immunohistochemistry staining procedures.

Table 1. Recommended Staining Protocol for anti-bcl-2 (SP66) with *ultraView* Universal DAB Detection Kit on a BenchMark XT instrument and BenchMark ULTRA instrument.

Procedure Type	Method
Deparaffinization	Selected
Cell Conditioning (Antigen Unmasking)	Cell Conditioning 1, Standard
Antibody (Primary)	BenchMark XT instrument 16 minutes, 37°C BenchMark ULTRA instrument 24 minutes, 36°C
Counterstain	Hematoxylin II, 4 minutes
Post Counterstain	Bluing, 4 minutes





**Table 2.** Recommended Staining Protocol for anti-bcl-2 (SP66) with VIEW DAB Detection Kit on a BenchMark ULTRA instrument.

Procedure Type	Method
Deparaffinization	Selected
Cell Conditioning (Antigen Unmasking)	Cell Conditioning 1, Standard
Antibody (Primary)	BenchMark ULTRA instrument 32 minutes, 36°C
Counterstain	Hematoxylin II, 4 minutes
Post Counterstain	Bluing, 4 minutes

**Table 3.** Recommended Staining Protocol for anti-bcl-2 (SP66) with OptiView DAB IHC Detection Kit on a BenchMark ULTRA instrument.

Procedure Type	Method
Deparaffinization	Selected
Cell Conditioning (Antigen Unmasking)	Cell Conditioning 1, 48 minutes
Pre Primary Peroxidase Inhibitor	Selected
Antibody (Primary)	BenchMark ULTRA instrument 16 minutes, 36°C
Counterstain	Hematoxylin II, 4 minutes
Post Counterstain	Bluing, 4 minutes

Due to variation in tissue fixation and processing, as well as general lab instrument and environmental conditions, it may be necessary to increase or decrease the primary antibody incubation, cell conditioning or protease pretreatment based on individual specimens, detection used, and reader preference. For further information on fixation variables, refer to "Immunohistochemistry Principles and Advances".<sup>7</sup>

#### POSITIVE TISSUE CONTROL

Examples of positive control tissues for this antibody are B cells of the mantle zone and interfollicular T cells in tonsil.

#### STAINING INTERPRETATION

The cellular staining pattern for anti-bcl-2 (SP66) is cytoplasmic.

#### SPECIFIC LIMITATIONS

Some tissues may exhibit vessel endothelial and muscle staining with this antibody, which does not interfere with the interpretation of specific staining.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Staining tests for specificity, sensitivity, and repeatability were conducted and the results are listed in Table 4 and Table 5 and in the Repeatability section.

##### Specificity

**Table 4.** Specificity of anti-bcl-2 (SP66) was determined by testing formalin-fixed, paraffin-embedded normal tissues.

Tissue	# positive / total cases	Tissue	# positive / total cases
Cerebrum	0/3	Thymus	2/3
Cerebellum	0/3	Myeloid (bone marrow)	3/3
Adrenal gland	0/3	Lung	0/3
Ovary	3/3	Heart	0/3

Tissue	# positive / total cases	Tissue	# positive / total cases
Pancreas	0/3	Esophagus	0/3
Parathyroid gland	1/1	Stomach	0/3
Hypophysis	3/3	Small intestine	2/3
Testis	0/3	Colon	3/3
Thyroid	6/6	Liver	0/3
Breast	3/3	Salivary gland	0/3
Spleen	3/3	Kidney	2/3
Tonsil	3/3	Prostate	1/3
Endometrium	2/3	Cervix	1/3
Skeletal muscle	0/2	Skin	3/3
Nerve (sparse)	0/3	Mesothelium	0/3

##### Sensitivity

**Table 5.** Sensitivity of anti-bcl-2 (SP66) was determined by testing a variety of formalin-fixed, paraffin-embedded neoplastic tissues.

Pathology	# positive / total cases
Glioblastoma	0/1
Atypical meningioma	0/1
Malignant ependymoma	1/1
Malignant oligodendroglioma	1/1
Serous papillary adenocarcinoma	0/1
Mucinous papillary adenocarcinoma	0/1
Islet cell carcinoma	0/1
Pancreatic adenocarcinoma	0/1
Seminoma	0/1
Embryonal carcinoma	0/1
Medullary carcinoma	1/1
Papillary carcinoma	1/1
Breast intraductal carcinoma	0/1
Breast intraductal carcinoma with early infiltrate	1/1
Breast invasive ductal carcinoma	0/1
Lung small cell undifferentiated carcinoma	0/1
Lung squamous cell carcinoma	0/1
Lung adenocarcinoma	0/1
Esophageal squamous cell carcinoma	0/1
Esophageal adenocarcinoma	0/1
Gastric mucinous adenocarcinoma	0/1
Gastrointestinal adenocarcinoma	0/3



Pathology	# positive / total cases
Malignant interstitialoma	3/3
Hepatocellular carcinoma	0/1
Hepatoblastoma	1/1
Renal clear cell carcinoma	0/1
Prostatic adenocarcinoma	1/2
Leiomyoma	0/1
Endometrial adenocarcinoma	0/1
Endometrial clear cell carcinoma	0/1
Uterine squamous cell carcinoma	1/2
Embryonal rhabdomyosarcoma	1/1
Anal malignant melanoma	1/1
Basal cell carcinoma	1/1
Squamous cell carcinoma	1/1
Neurofibroma	0/1
Ganglioneuroblastoma	1/1
Epithelial malignant mesothelioma	0/1
Diffuse large B-cell lymphoma	60/86
Diffuse B-cell lymphoma	38/49
Nodular diffuse B-cell lymphoma	5/6
Mucosa-associated B-cell lymphoma	3/3
Follicular lymphoma	26/29
Hodgkin lymphoma	1/27
Burkitt-like lymphoma	1/1
Lymphocytic plasmacytoid lymphoma	2/2
Mantle-cell lymphoma	1/1
T-cell lymphoma	2/2
Diffuse clear T-cell lymphoma	0/1
Diffuse T-cell lymphoma	1/2
Anaplastic large cell lymphoma	4/5
Lennert lymphoma	1/1
Reactive follicles of lymph node	0/3
Diffuse malignant lymphoma	1/1
Bladder transitional cell carcinoma	1/1
Leiomyosarcoma	1/1
Osteosarcoma	0/1
Spindle cell rhabdomyosarcoma	0/1
Intermediate grade leiomyosarcoma	0/1

### Repeatability

Repeatability studies for anti-bcl-2 (SP66) were completed to demonstrate:

- Inter-lot reproducibility of the antibody.
- Intra-run and Inter-run reproducibility on a BenchMark XT instrument.
- Intra-platform reproducibility on the BenchMark XT instrument and the BenchMark ULTRA instrument.
- Inter-platform reproducibility between the BenchMark XT instrument and BenchMark ULTRA instrument.

All studies met their acceptance criteria.

### REFERENCES

1. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol. 1998;16:395-419.
2. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tunekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. N Engl J Med. 1993;329:690-4.
3. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. Blood. 1993;81:3091-6.
4. Masir, N, et al. BCL2 protein expression in follicular lymphomas with t(14;18) chromosomal translocations. Br J Haematol. 2008;144:716-25.
5. Masir, N, et al. Pseudonegative BCL2 protein expression in a t(14;18) translocation positive lymphoma cell line: a need for an alternative BCL2 antibody. Pathology. 2010;42(3):212-16.
6. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
7. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.

### INTELLECTUAL PROPERTY

BENCHMARK, *ultraView*, VENTANA, and the VENTANA logo are trademarks of Roche.

All other trademarks are the property of their respective owners.

Ventana Medical Systems, Inc. grants to the Purchaser a single use only license under U.S. Pat. Nos. 6045759, 6945128, and 7378058, and any foreign counterparts.

©2011 Ventana Medical Systems, Inc.

### CONTACT INFORMATION



Ventana Medical Systems, Inc.  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755  
USA  
+1 520 887 2155  
+1 800 227 2155 (USA)

[www.ventana.com](http://www.ventana.com)



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany





## LIITE 3: DAKO AUTOSTAINER IHK-PROTOKOLLA 1



Kliinisen patologian yksikkö  
Kuopion Yliopistollinen Sairaala  
Kuopio



## Slide Detail Report

Case number  
H10520-08  
Name

Slide number	External Slide number	Block	Type	Preparation	Deparaffinization	Target retrieval	Protocol		Slide notes
25248		JL		FFPE	<input checked="" type="checkbox"/>	FLEX TRS High	KYS ALK1 1:100		
Drop zones	Stainer - rack : position		Programmed	Completed		User	Control		
			8.4.2013 11:09:32			varjaykset, immuno	<input type="checkbox"/>		
Code	Reagent name	Volume (µl)	Incubation						
	Buffer		0						
SM801	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	150	5						
	Buffer		0						
	ALK1 1:100 Novocastra	150	20						
	Buffer		0						
SM802	EnVision FLEX /HRP	150	20						
	Buffer		0						
	Buffer		5						
SM803	Substrate Working Solution (mix)	300	10						
	Buffer		0						
SM806	EnVision FLEX Hematoxylin	150	5						
	DI Water		0						
	Buffer		5						
	DI Water		0						

## LIITE 4: DAKO AUTOSTAINER IHK-PROTOKOLLA 2



Kliinisen patologian yksikkö  
Kuopion Yliopistollinen Sairaala  
Kuopio



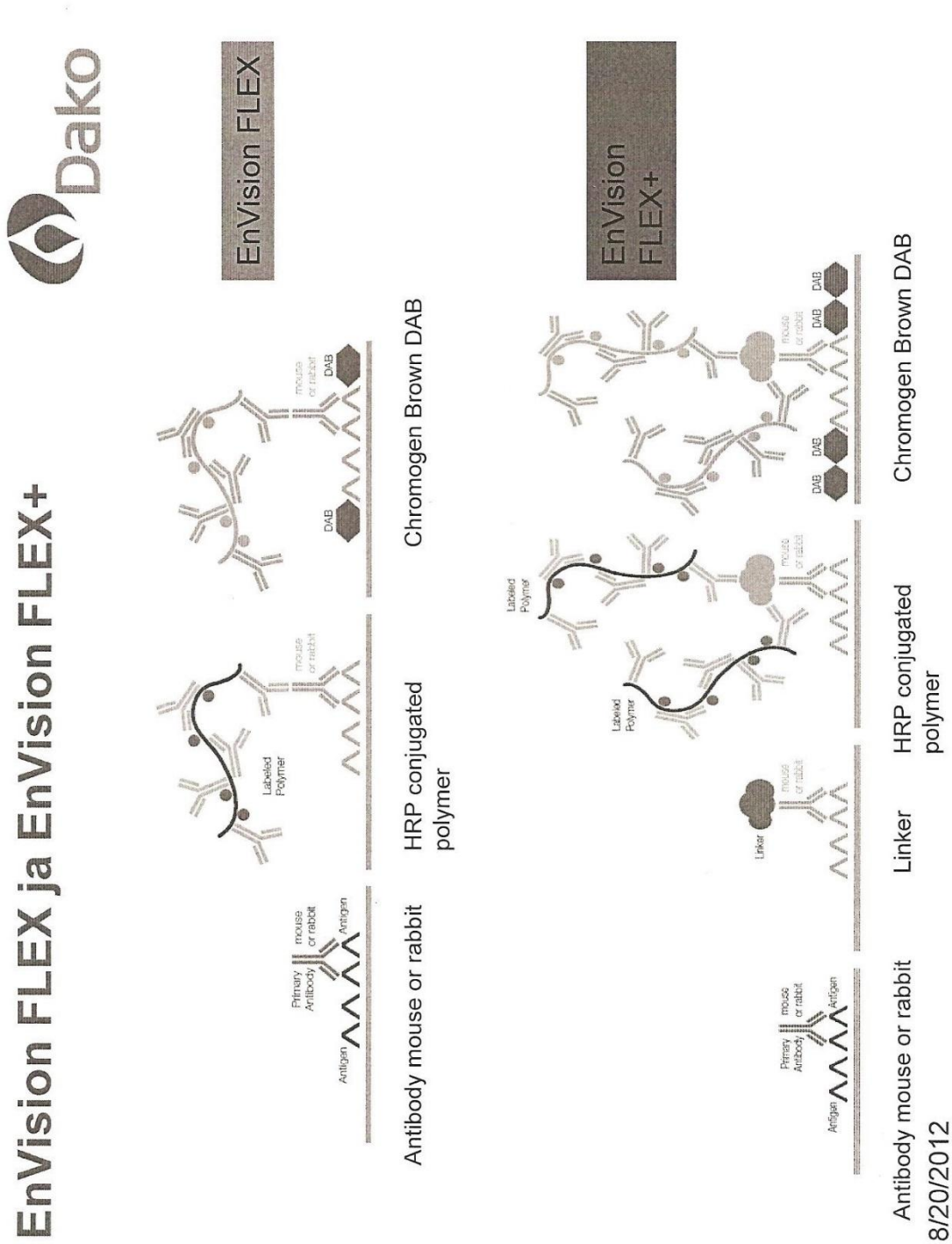
## Slide Detail Report

Case number  
H10520-08  
Name

Slide number 25247	External Slide number	Block JL	Type	Preparation FFPE	Deparaffinization <input checked="" type="checkbox"/>	Target retrieval FLEX TRS Low	Protocol ALK1 1:50	Control <input type="checkbox"/>	Slide notes
Drop zones 	Stainer - rack : position		Programmed 8.4.2013 11:08:58	Completed		User varjaykset, immuno			
Code	Reagent name	Volume (µl)	Incubation						
	Buffer		0						
SM801	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	150	5						
	Buffer		0						
	ALK1 1:50 5A4 NOVOCASTR	150	20						
	Buffer		0						
SM804	EnVision FLEX+ Mouse (LINKER)	150	15						
	Buffer		0						
SM802	EnVision FLEX /HRP	150	20						
	Buffer		0						
	Buffer		5						
SM803	Substrate Working Solution (mix)	300	10						
	Buffer		0						
SM806	EnVision FLEX Hematoxylin	150	5						
	DI Water		0						
	Buffer		5						
	DI Water		0						

Printed by: varjaykset, immuno  
Printed on: 8.4.2013 12:36:30

Version: 1.9.21.516  
Page 1



## LIITE 6: VENTANA IHK-VÄRJÄYSPROTOKOLLA

**Protocol # 101 : BCL2 (07.03.2013)****Procedure: XT ultraView DAB v3****BenchMark XT IHC/ISH Staining Module**

Step No	Procedure Step
1	***** Select EZ Prep *****
2	***** Start Timed Steps *****
3	***** Mixers Off *****
4	Warmup Slide to 75 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
5	Apply <u>EZPrep Volume Adjust</u>
6	Rinse Slide
7	Apply <u>EZPrep Volume Adjust</u>
8	Rinse Slide
9	Apply <u>EZPrep Volume Adjust</u>
10	Apply Coverslip
11	Warmup Slide to 76 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
12	Rinse Slide
13	Apply Depar Volume Adjust
14	Apply Coverslip
15	Disable Slide Heater
16	***** Mixers On *****
17	[ Short - 8 Minute Conditioning ]
18	Rinse Slide
19	Apply <u>Long Cell Conditioner #1</u>
20	Apply CC Coverslip Long
21	***** Select SSC Wash *****
22	Warmup Slide to <u>95 Deg C</u> , and Incubate for 8 Minutes
23	[ Mild - 30 Minute Conditioning ]
24	Apply Cell Conditioner #1
25	Apply CC Medium Coverslip No BB
26	Warmup Slide to 100 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
27	Apply CC Medium Coverslip No BB
28	Apply Cell Conditioner #1
29	Apply CC Medium Coverslip No BB
30	Apply Cell Conditioner #1
31	Apply CC Medium Coverslip No BB
32	Apply Cell Conditioner #1
33	Apply CC Medium Coverslip No BB
34	Apply Cell Conditioner #1
35	Apply CC Medium Coverslip No BB
36	Apply Cell Conditioner #1
37	Apply CC Medium Coverslip No BB
38	Disable Slide Heater
39	Incubate for 8 Minutes
40	Rinse Slide With Reaction Buffer
41	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
42	Apply Coverslip
43	Rinse Slide With Reaction Buffer
44	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
45	Apply Coverslip

\* one drop is one reagent dispense

KYS-Kuvantamiskeskus klin. Pat. Yksikko cc 411P, rak. 1B 3 kerros Puijonlaaksontie 2 70210 KUOPIO  
NexES v10.6

Printed 12.03.2013 9:09:56

Page 1 of 2

## Protocol # 101 : BCL2 (07.03.2013)

### Procedure: XT ultraView DAB v3

### BenchMark XT IHC/ISH Staining Module

Step No	Procedure Step
46	***** Procedure Synchronization *****
47	Warmup Slide to 37 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
48	Rinse Slide With Reaction Buffer
49	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
50	<u>Apply One Drop of UV INHIBITOR, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes</u>
51	Rinse Slide With Reaction Buffer
52	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
53	Apply Coverslip
54	Warmup Slide to 37 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
55	Rinse Slide With Reaction Buffer
56	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
57	Apply Coverslip
58	<u>Apply One Drop of [bcl-2 (SP66)] ( Antibody ), and Incubate for [0 Hr 32 Min]</u>
59	Rinse Slide With Reaction Buffer
60	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
61	Apply Coverslip
62	Warmup Slide to 37 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
63	Rinse Slide With Reaction Buffer
64	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
65	<u>Apply One Drop of UV HRP UNIV MULT, Apply Coverslip, and Incubate for 8 Minutes</u>
66	Rinse Slide With Reaction Buffer
67	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
68	Apply Coverslip
69	Rinse Slide With Reaction Buffer
70	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
71	<u>Apply One Drop of UV DAB and One Drop of UV DAB H2O2, Apply Coverslip, Incubate for 8 Minutes</u>
72	Rinse Slide With Reaction Buffer
73	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
74	<u>Apply One Drop of UV COPPER, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes</u>
75	Rinse Slide With Reaction Buffer
76	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
77	<u>Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]</u>
78	Rinse Slide With Reaction Buffer
79	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
80	Apply Coverslip
81	Rinse Slide With Reaction Buffer
82	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
83	<u>Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]</u>
84	Rinse Slide With Reaction Buffer
85	Apply Coverslip
86	Disable Slide Heater
87	***** Select Optional Wash *****
88	***** Select SSC Wash *****
89	***** Start Timed Steps *****
90	Rinse Slide With Reaction Buffer

\* one drop is one reagent dispense

KYS-Kuvantamiskeskus klini. Pat. Yksikko cc 411P, rak. 1B 3 kerros Puijonlaaksontie 2 70210 KUOPIO  
NexES v10.6

Printed 12.03.2013 9:09:56

Page 2 of 2



## LIITE 7: ALK-KOETIN


**ALK FISH DNA Probe, Split Signal  
Code Y5417**

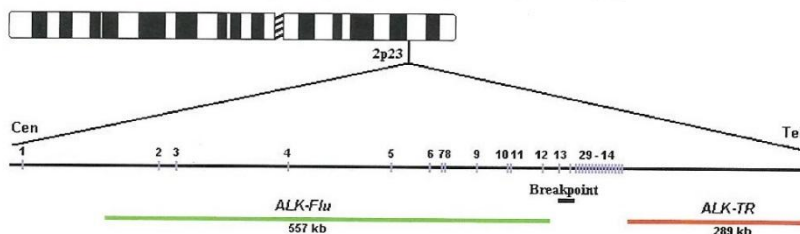
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

**Recommended use**

ALK FISH DNA Probe, Split Signal, is recommended for the detection of translocations involving the *ALK* locus at chromosome 2p23 by fluorescence in situ hybridization (FISH). When the probe is used on cytology specimens the Dako Cytology FISH Accessory Kit, Code K5499, is recommended. If the probe is used on histology specimens the Dako Histology FISH Accessory Kit, Code K5599, is recommended. Both kits contain all key reagents, except for the probe, necessary to perform 20 FISH assays. It is recommended to denature at 82 °C for 5 minutes and hybridize at 45 °C in a humidified chamber for 14-20 hours, as described in the enclosed working procedure with the selected accessory kit.

**Introduction**

The human *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) gene at chromosome 2 band p23 (1) consists of 29 exons and spans a region of ~729 kb. The *ALK* gene encodes a protein containing an extracellular domain, a transmembrane domain, a tyrosine kinase domain, and a C-terminal intracytoplasmic domain (2). The two DNA probes within *ALK* FISH DNA Probe, Split Signal, are designed to hybridize upstream and downstream of the breakpoint cluster region. Co-localization of the probes results in a red/green signal, whereas translocation events in the breakpoint cluster region will split one signal in separate green (fluorescein) and red (Texas Red) signals.


**Target (red)**

The Texas Red-labeled DNA probe (*ALK-TR*) binds to a 289 kb segment telomeric to the *ALK* breakpoint cluster region on chromosome 2p23.

**Target (green)**

The fluorescein-labeled DNA probe (*ALK-Flu*) binds to a 557 kb segment centromeric to the *ALK* breakpoint cluster region on chromosome 2p23.

**Probe gap**

The gap between *ALK-TR* and *ALK-Flu* is 104 kb.

**Reagent provided**

*ALK* FISH DNA Probe, Split Signal, is a mixture of two fluorochrome-labeled DNA probes and unlabeled PNA blocking probes. The DNA probes in the mixture consist of a fluorescein-labeled probe (*ALK-Upstream*) and a Texas Red-labeled probe (*ALK-Downstream*).

The reagent is provided in liquid form in hybridization solution containing 45% formamide, 10% dextran sulphate, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L phosphate, and blocking agent.

**Specificity**

99.8%. Defined as the mean of 6 independent countings of 1050 cells from normal peripheral blood.

**Precautions**

1. The device is not intended for clinical use including diagnosis, prognosis, and monitoring of a disease state, and it must not be used in conjunction with patient records or treatment.

2. The reagent contains 45% formamide and is labeled:

Toxic.

R61 May cause harm to the unborn child.

S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show label where possible).

S53 Avoid exposure – obtain special instructions before use.

S60 This material and/or its container must be disposed of as hazardous waste.

As a main rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper working procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.

**Storage**

Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. There are no obvious signs to indicate instability of this product. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact Dako Technical Services.

**References**

1. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994;263:1281-1284.
2. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, et al. Molecular characterization of *ALK*, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14:439-49.

## LIITE 8: BCL2-KOETIN


**BCL2 FISH DNA Probe, Split Signal  
Code Y5407**

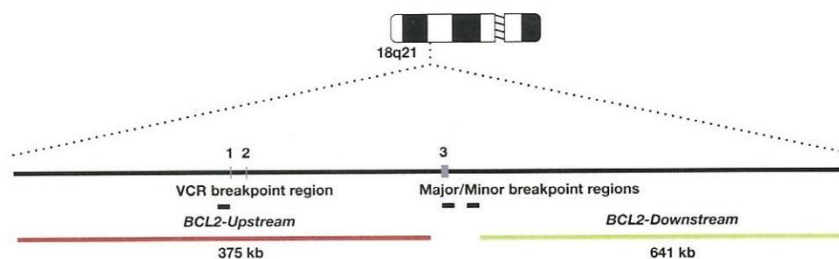
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

**Recommended use**

*BCL2* FISH DNA Probe, Split Signal, is recommended for the detection of translocations involving the *BCL2* locus at chromosome 18q21 by fluorescence in situ hybridization (FISH). When the probe is used on cytology specimens the Dako Cytology FISH Accessory Kit, code K5499, is recommended. If the probe is used on histology specimens the Dako Histology FISH Accessory Kit, code K5599, is recommended. Both kits contain all key reagents, except for the probe, necessary to perform 20 FISH assays. It is recommended to denature at 82°C for 5 minutes and hybridize at 45 °C in a humidified chamber for 14-20 hours, as described in the enclosed working procedure with the selected accessory kit.

**Introduction**

The human *BCL2* (B-cell leukemia/lymphoma 2) gene at chromosome 18 band q21 (1) consists of 3 exons (2) and spans a region of 195 kb. The *BCL2* gene encodes an integral outer mitochondrial membrane protein that blocks apoptotic cell death (3). The two DNA probes within the *BCL2* FISH DNA Probe, Split Signal, are designed to hybridize upstream and downstream of the major/minor breakpoint cluster regions. Co-localization of the probes results in a red/green signal, whereas translocation events in the major/minor breakpoint cluster regions will split one signal into separate green (fluorescein) and red (Texas Red) signals. Chromosomal breaks occurring in the variant translocation breakpoint region will split the red signal into two red signals per affected chromosome.


**Target (red)**

The Texas Red-labeled DNA probe (*BCL2-Upstream*) binds to a 375 kb segment telomeric to the *BCL2* major/minor breakpoint cluster regions on chromosome 18q21.

**Target (green)**

The fluorescein-labeled DNA probe (*BCL2-Downstream*) binds to a 641 kb segment centromeric to the *BCL2* major/minor breakpoint cluster regions on chromosome 18q21.

**Probe gap**

The gap between *BCL2-Upstream* and *BCL2-Downstream* is 39 kb.

**Reagent provided**

*BCL2* FISH DNA Probe, Split Signal, is a mixture of two fluorochrome-labeled DNA probes and unlabeled PNA blocking probes. The DNA probes in the mixture consist of a fluorescein-labeled probe (*BCL2-Downstream*) and a Texas Red-labeled probe (*BCL2-Upstream*).

The reagent is provided in liquid form in hybridization solution containing 45% formamide, 10% dextran sulphate, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L phosphate, and blocking agent. The vial contains 200 µL corresponding to 20 tests (10 µL per test).

**Specificity**

99.6%. Defined as the mean of 6 independent countings of 1050 cells from normal peripheral blood.

**Precautions**

1. The device is not intended for clinical use including diagnosis, prognosis, and monitoring of a disease state, and it must not be used in conjunction with patient records or treatment.

2. The reagent contains 45% formamide and is labeled:

Toxic.

R61 May cause harm to the unborn child.

S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show label where possible).

S53 Avoid exposure – obtain special instructions before use.

S60 This material and/or its container must be disposed of as hazardous waste.

As a main rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper working procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.

## LIITE 9: DAKO AUTOSTAINER KISH-PROTOKOLLA



Kliinisen patologian yksikkö  
Kuopion Yliopistollinen Sairaala  
Kuopio



## Slide Detail Report

Case number

Q

Name

Slide number	External Slide number	Block	Type	Preparation FFPE	Deparaffinization	Target retrieval	Protocol	Dako DuoCISH	Slide notes
24550					<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		
Drop zones	Stainer - rack : position		Programmed	Completed		User		Control	
			13.3.2013 10:44:08			varjaykset, immuno		<input type="checkbox"/>	
Code	Reagent name	Volume (µl)	Incubation						
	Buffer		0						
SK108	Peroxidase Block	200	5						
	Buffer		0						
SK108	CISH Antibody Mix	200	30						
	Buffer		0						
	Buffer		0						
SK108	Red Chromogen Solution	200	10						
	Buffer		0						
	Buffer		0						
SK108	Blue Chromogen Solution	200	10						
	Buffer		0						
	Buffer		0						
S3301	Diluted Hematoxylin	200	5						
	Buffer		0						
	Buffer		5						
	DI Water		0						
	DI Water		0						

Q  
Dako DuoCISH  
13.3.2013  
(none)



# LIITE 10: STEP-BY-STEP FISH PROCEDURE FOR HISTOLOGY SAMPLES



## Histology FISH Accessory Kit | Step-by-Step FISH Procedure for Histology Samples

Code K5599/20 tests

### DAY 1

#### Reagents Preparation

**Diluted Pre-Treatment Solution**  
Dilute Vial 1 1:20 using distilled or deionized water.

**Diluted Wash Buffer**  
Dilute Vial 3 1:20 using distilled or deionized water.

**Diluted Stringency Buffer**  
Dilute Vial 4 1:20 using distilled or deionized water.

**Ethanol series**  
Prepare 3 jars with 70%, 85%, and 96% ethanol, respectively.

#### Equilibration of Reagents

**Vial 1** Diluted Pre-Treatment Solution, equilibrate to 95-99 °C.  
**Vial 2** Pepsin, do not equilibrate, keep cold continuously (2-8 °C).  
**Vial 3** Diluted Wash Buffer, equilibrate to 20-25 °C.  
**Vial 4** Diluted Stringency Buffer, equilibrate one jar to 20-25 °C + one jar to 65 ± 2 °C.  
**Vial 5** Fluorescence Mounting Medium, can be applied at 2-25 °C.  
**Item 6** Coverslip Sealant can be applied at 2-25 °C.  
**Probe Mix** Can be applied at 2-25 °C.

#### Guidelines for Slide Preparation

Only tissue preserved in neutral buffered formalin (fixation time 18-24 hours) and paraffin-embedded is suitable for use.

##### Slide preparation:

1. Cut sections of 4-6 µm on water bath, collected on slides and air-dried.
2. Place slides at 60 °C for 30-60 min to melt the paraffin.
3. Store at 2-8 °C if not used immediately.

#### Deparaffinization and Rehydration at Room Temperature

● Xylene\* ● Xylene\* ● Ethanol 96% ● Ethanol 96% ● Ethanol 70% ● Ethanol 70%  
5 min 5 min 2 min 2 min 2 min 2 min

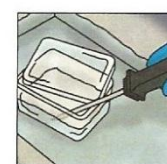
\* Or xylene substitutes



● To finish, soak slides 2 min in diluted Wash Buffer.

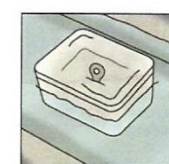
#### Pre-Treatment

Place a jar filled with diluted Pre-Treatment Solution in a water bath and heat to 95-99 °C. Measure temperature.



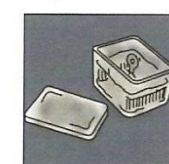
Heat Pre-Treatment Solution, 95-99 °C

Immerse the slides into the preheated diluted Pre-Treatment Solution. Re-check temperature. Incubate for 10 min.



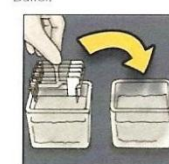
Immerse slides in jar, 10 min 95-99 °C

Remove the jar from the bath. Take off the lid and let the slides cool in the jar for 15 min at room temperature.



Cool off slides, 15 min

Wash the slides in diluted Wash Buffer for 3 min at room temperature. Repeat with fresh Wash Buffer.



Soak in Wash Buffer, 3 min + 3 min

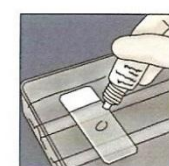
#### Pepsin Digestion (Pepsin RTU - Ready-to-Use)

Tap off excess buffer and wipe around the specimen using lintless tissue.



Tap off and wipe.

Apply 5-8 drops (250 µL) of cold (2-8 °C) RTU Pepsin to cover the tissue on the slide.



Apply cold Pepsin.

Place slides on heating block pre-heated to 37 °C or on Hybridizer with lid open (Fixed Temp program at 37 °C).



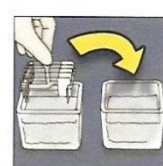
Slides on Hybridizer at 37 °C

Incubate slides for 3-6 min at 37 °C.



Incubation, 3-6 min 37 °C

Tap off RTU Pepsin and place slides in diluted Wash Buffer for 3 min at room temperature. Repeat process with fresh Wash Buffer.



Soak in Wash Buffer, 3 min + 3 min

#### Check Digestion

**Optional steps:** Propidium iodide can be used to evaluate the effect of Pepsin digestion.

Use fluorescence microscope with Texas Red/FITC double filter for evaluation.

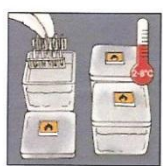
Digestion is acceptable if nuclei are red with well-defined perimeters.

If the nuclei are still green by autofluorescence, the digest cycle should be repeated.

See Appendix 2 in Kit Working Procedure for practical details.

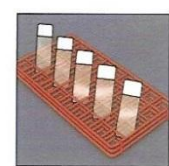
#### Dehydration

Dehydrate tissue sections using graded ethanol series: 70%, 85%, and 96% ethanol – each step 2 min.



Dehydrate in ethanol, 2 min + 2 min + 2 min

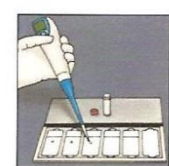
Allow slides to air-dry completely in upright position (approx. 15-20 min). Avoid strong light for the remaining steps.



Air-dry tissue sections, 15-20 min

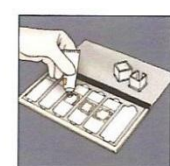
#### Probe Application

In a fume hood, apply 10 µL of Probe Mix to the center of the section. Place the coverslip immediately – allow it to spread evenly and avoid air bubbles.



Apply Probe Mix.

The coverslip is sealed carefully with Coverslip Sealant all around the periphery. Coverslip Sealant should overlap the coverslip and the slides and cover the entire edge.



Seal coverslip.

\* A set incubation time of 3-6 minutes will be adequate for most specimens prepared as described in the Specimen Preparation section of the Kit Working Procedure. Use of different fixation methods might increase the required digestion time to 7-15 min or even higher.

##### Optimal Pepsin incubation time:

The optimal incubation time depends on tissue type, tissue fixation, thickness of specimen, and specimen maturation, and should be determined by the user.

##### Incubation at room temperature:

Pepsin treatment can, as an alternative, be performed at room temperature (20-25 °C) for 5-30 minutes. An incubation time of 10-20 minutes will be adequate for most specimens, but the user should determine the optimal incubation time.

##### Fixation time:

Extending fixation time beyond the specified 18-24 hours might increase the required Pepsin digestion time.

### Automated Denaturation & Hybridization in Dako Hybridizer

Program the Hybridizer. 5 min denaturation at 82 °C and overnight (14-20 h) hybridization at 45 °C (pre-set protocol).



Program the Hybridizer.

Add slides. Insert two Humidity Control Strips into lid and saturate strip with distilled or deionized water. Close lid and start protocol.



Moisten strips and add slides.

### Denaturation & Hybridization, Manual Procedure

Moisten paper tissue placed in hybridization chamber and preheat in oven (82 °C).



Moisten and pre-heat chamber.

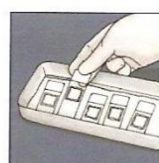
Place slides 5 min on heating block or a block in a hybridization oven preheated to 82 ± 2 °C.



Denaturation.

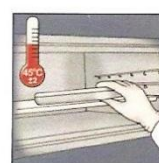
○ 5 min 82 ± 2 °C

Place slides in the pre-heated (82 °C) humidified hybridization chamber. Cover with a lid.



Place slides in humidity chamber.

Incubate the slides in the chamber overnight (14-20 h) at 45 ± 2 °C.



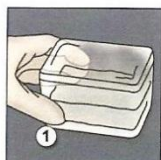
Incubate overnight.

14-20 h 45 ± 2 °C

## DAY 2

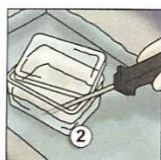
### Stringent Wash

Fill two jars with diluted Stringency Buffer. Place jar 1 with a lid in a fume hood at room temperature (20-25 °C).



Place jar 1 with Stringency Buffer in fume hood at room temperature.

Place jar 2 with a lid in water bath and pre-heat to 65 ± 2 °C.



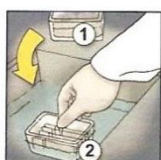
Pre-heat jar 2 with Stringency Buffer.  
65 ± 2 °C

Gently remove seal and coverslip from slides in hybridization chamber, and put slides in jar 1 from the fume hood, one slide at a time.



Remove coverslips and put slides in jar at room temperature.

Transfer slides to jar 2 pre-heated in the water bath. Perform stringent wash for 10 min at 65 ± 2 °C.



Perform stringent wash.  
10 min 65 ± 2 °C

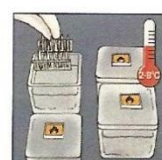
Remove slides from Stringency Buffer and place them in diluted Wash Buffer for 3 min at room temperature.



Soak in Wash Buffer.  
3 min + 3 min

### Dehydration

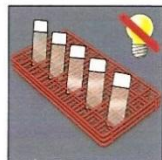
Dehydrate tissue sections using graded ethanol series: 70%, 85%, and 96% ethanol – each step 2 min.



Dehydrate in ethanol.  
2 min + 2 min + 2 min

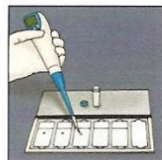
### Mounting & Reading

Allow slides to air-dry completely in upright position (approx. 15-20 min). Avoid strong light.



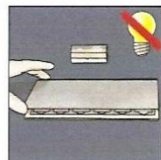
Air-dry tissue sections.  
15-20 min

Apply 15 µL of Fluorescence Mounting Medium to the target area of the slide and apply coverslips.



Apply 15 µL Mounting Medium.

Place slides in darkness. Slides may be read after 15 min or within 7 days. To minimize fading, store slides in the dark at 2-8 °C.



Store in the dark.  
Reading after 15 min

Use fluorescence microscope with DAPI filter and Texas Red/FITC double filter or single filters and 100 W lamp for interpretation of results.



Interpretation of results.

### Translocations

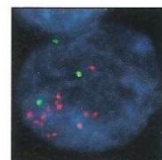
Separate red and green signals indicate a translocation with Split Signal probes. Fused red/green (yellow) signal shows normal allele.



Reading translocations (R + G) or deletions (R or G).

### Amplifications

Red signals show number of genes. Green signals e.g. reference. R/G = 1 might suggest gene amplifications or deletions.



Reading gene amplifications or deletions.

The Histology FISH Accessory Kit is optimized for performing FISH on histology samples with Dako probes.

The kit can also be used with probes requiring other denaturation and hybridization conditions.



### Histology FISH Accessory Kit, Code No. K5599

- Vial 1 Pre-Treatment Solution (x 20), 75 mL
- Vial 2 Pepsin, ready-to-use, 5 mL
- Vial 3 Wash Buffer (x 20), 500 mL
- Vial 4 Stringency Buffer (x 20), 150 mL
- Vial 5 Fluorescence Mounting Medium with blue counterstain, ready-to-use, 0.3 mL
- Item 6 Coverslip Sealant, ready-to-use, 1 tube

Detailed Working Procedure included in the kit.

The kit contains reagents sufficient for 20 tests or maximum 10 individual staining runs.



## LIITE 11: KISH KOETINKOHTAISET PROTOKOLLAT

## Dako DuoCISH with Split-Signal Probes:

## Trouble shooting guide:

The table below indicates what kind of protocol the customer should use in order to get optimal results with DuoCISH and split-signal probes:

Product code	Probe	Works in standard DuoCISH protocol	Works in modified protocol	Works in modified protocol + 20 min stringent wash	Is currently not working
Y5400	ETV6				
Y5401	MLL				
Y5402	TCF3				
Y5403	BCR				
Y5404	TLX3				
Y5405	SIL-TAL1				
Y5406	IGH				
Y5407	BCL2				
Y5408	BCL6				
Y5409	MALT1				
Y5410	MYC				
Y5411	BCL3				
Y5412	IGL				
Y5413	PAX5				
Y5414	CCND1				
Y5415	TLX1				
Y5416	IGK				
Y5417	ALK				
Y5418	BCL10				
Y5419	TCRAD				
Y5420	TCRG				
Y5421	TCRB				
Y5422	FIP1L1-PDGFR				
Y5426	TCL1				

The standard DuoCISH protocol for split-signal probes is:

## Step 1: Wash

Instead of performing the last step in the Dako FISH staining (dehydration, air-drying and mounting the slides with fluorescent mounting media) the slides for the CISH staining are immersed in diluted wash buffer for 3 minutes.

## Step 2: Peroxidase Block

Tap off excess buffer. Using a lintless tissue carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagents within the prescribed area. Cover specimen with 200 µL Peroxidase block.

Incubate 5 (+/-1) minutes

Immerse in diluted wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

Step 3: CISH antibody mix

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200 µL CISH antibody mix. Incubate 30 (+/-1) minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

Step 4: Red Chromogen Solution.

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200 µL Red chromogen solution. Incubate 10 minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

Step 5 : Blue Chromogen solution

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200 µL Blue chromogen solution. Incubate 10 minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

Step 6: Counterstain

Immerse slides in hematoxylin diluted 1:7 for 5 minutes. Rinse with wash buffer and place tissue sections in a fresh wash buffer bath for a minimum of 5 minutes to blue hematoxylin counterstain. Rinse thoroughly with distilled or deionised water. Air dry sections or dry sections 30 minutes at 37°C on Dako Hybridizer. Allow sections to cool to room temperature before mounting.

Step 7: Mounting

After tissue specimens have been left to air dry completely, coverslip with aqueous mounting, use e.g. Aquatex from Merck.

#### Modified Protocol for Split-Signal probes:

Step 1: Wash

Instead of performing the last step in the Dako FISH staining (dehydration, air-drying and mounting the slides with fluorescent mounting media) the slides for the CISH staining are immersed in diluted wash buffer for 3 minutes.

Step 2: Peroxidase Block

Tap off excess buffer. Using a lintless tissue carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagents within the prescribed area. Cover specimen with 200 µL Peroxidase block.

Incubate 5 (+/-1) minutes

Immerse in diluted wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

Step 3: CISH antibody mix

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200  $\mu$ L CISH antibody mix. Incubate 30 (+/-1) minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

#### Step 4: Red Chromogen Solution.

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200  $\mu$ L Red chromogen solution. Incubate 10 minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

#### Step 5 : Blue Chromogen solution

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200  $\mu$ L 2 x diluted Blue chromogen solution (use 37.5  $\mu$ L chromogen instead of 75  $\mu$ L per 1 mL buffer solution). Incubate 10 minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

#### Step 6: Dry sections

No counterstaining is used. Instead rinse slides thoroughly with distilled or deionised water. Air dry sections or dry sections 30 minutes at 37°C on Dako Hybridizer. Allow sections to cool to room temperature before mounting.

#### Step 7: Mounting

After tissue specimens have been left to air dry completely, coverslip with aqueous mounting, use e.g. Aquatex from Merck.

#### Modified protocol + 20 min stringent wash for Split-signal probes:

##### Step 4 in FISH procedure: Stringent Wash

As soon as all coverslips have been removed, transfer slides from the room temperature, prewash jar to the 65 ( $\pm$ 2) °C jar in the water bath. Perform stringent wash for exactly 20 minutes<sup>1</sup> at 65 ( $\pm$ 2) °C. Remove slides from the diluted Stringent Wash Buffer, and soak sections in diluted Wash Buffer for 3 minutes at room temperature (20-25 °C). Change diluted Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes.

Thereafter follow the modified CISH protocol:

##### Step 1: Wash

Instead of performing the last step in the Dako FISH staining (dehydration, air-drying and mounting the slides with fluorescent mounting media) the slides for the CISH staining are immersed in diluted wash buffer for 3 minutes.

---

<sup>1</sup> Prolonged stringent wash has only been tested on TLX3, BCL6, BCL3, BCL10, and FIP1L1-PDGFR $\alpha$  prior to CISH, where this improves the result. For probes working in either the standard DuoCISH protocol or the modified protocol, 10 min stringent wash has been shown to be sufficient.

**Step 2: Peroxidase Block**

Tap off excess buffer. Using a lintless tissue carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagents within the prescribed area. Cover specimen with 200  $\mu$ L Peroxidase block.

Incubate 5 (+/-1) minutes

Immerse in diluted wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

**Step 3: CISH antibody mix**

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200  $\mu$ L CISH antibody mix. Incubate 30 (+/-1) minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

**Step 4: Red Chromogen Solution.**

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200  $\mu$ L Red chromogen solution. Incubate 10 minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

**Step 5 : Blue Chromogen solution**

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Cover specimen with 200  $\mu$ L 2 x diluted Blue chromogen solution (use 37.5  $\mu$ L chromogen instead of 75  $\mu$ L per 1 mL buffer solution). Incubate 10 minutes in a humid chamber. Immerse in diluted Wash buffer for 3 minutes. Repeat once in fresh wash buffer.

**Step 6: Dry sections**

No counterstaining is used. Instead rinse slides thoroughly with distilled or deionised water. Air dry sections or dry sections 30 minutes at 37°C on Dako Hybridizer. Allow sections to cool to room temperature before mounting.

**Step 7: Mounting**

After tissue specimens have been left to air dry completely, coverslip with aqueous mounting, use e.g. Aquatex from Merck.

## LIITE 12: KUVALUETTELO

## Kuvaluettelo

Kuva 6 ALK-proteiinin tuotto anaplastisessa suurisolulymfoomaassa (ALCL 2), IHK-värijäys (20x) ...	18
Kuva 9 Anaplastisen suurisolulymfooman näyte (ALCL 2), jossa translokaatioita (40x) .....	22
Kuva 12 Normaali imusolmukkeen follikkeli, jossa ei havaita BCL2-proteiinin tuottoa (20x).....	28
Kuva 13 Follikulaarisessa lymfoomassa (FL 1) havaittava BCL2-proteiinin tuotto (2,5x) .....	28
Kuva 14 Keuhkonäytteitten monikudosblokki (2,5x) .....	34
Kuva 17 Keuhkonäytteen (NSCLC 1) IHK-värijäys, vasta-ainelaimennos 1:100 (20x) .....	47
Kuva 18 Keuhkonäytteen (NSCLC 1) IHK-värijäys, vasta-ainelaimennos 1:50 (20x) .....	47
Kuva 19 Neuroblastoomanäytteen (NB 2B) IHK-värijäys, vasta-ainelaimennos 1:100 (20x).....	47
Kuva 20 Neuroblastoomanäytteen (NB 2B) IHK-värijäys, vasta-ainelaimennos 1:50 (20x).....	47
Kuva 21 KISH-värijäys (NBL 2B), jossa liikaa sinistä kromogeeniä (40x).....	49
Kuva 22 Onnistunut neuroblastoomanäytteen (NBL 2B) KISH-värijäys (40x) .....	49
Kuva 23 KISH-värijäys (FL 2), jossa punainen kromogeeni on sakannut (40x).....	50
Kuva 24 Onnistunut follikulaarisen lymfooman (FL 2) KISH-värijäys (40x).....	50

Kaikki kuvat © Valtteri Juntunen & Evamaria Kokko 2013.

## LIITE 13: TUTKIMUSLUPA



Pohjois-Savon sairaanhoitopiiri  
KUOPION YLIOPISTOLLINEN SAIRAALA

HOITOTIETEEN JA MUIDEN TERVEYS-  
TIETEIDEN TUTKIMUSLUPAHAKEMUS

Nro \_\_\_\_\_ / 20 \_\_\_\_

Hakemuksen käsittely on kuvattu hallinnollisessa ohjeessa "Hoitotieteen ja muiden terveystieteiden tutkimuksen ohjeet Kuopion yliopistollisessa sairaalassa". Hakemukseen liitetään tutkimussuunnitelma aineiston keruulomakkeineen ja saatteineen, rahoitussuunnitelma.

### HAKIJA

Vastuullinen tutkija

Anita Aaltonen / Anna Tainiainen

Ks. seuraava sivu

Nimi

Osoite, puh, s-posti

Muut tutkijat

Vahteri Juntunen

Evamaria Kokko

Työ- tai opiskelupaikka

Savonia-ammattikorkeakoulu / Kuopio

Virka/toimi (ei koske opiskelijoita)

Opiskelupaikka

☒ AMK mikä

Savonia

☐ yliopisto mikä

☐ muu mikä

Suoritettava tutkinto

Biokemian kokeet

### TUTKIMUS

Tutkimuksen nimi

ALK1 ja BCL2 translokaatiokehien toiminnallisuus diagnostiikassa näytteissä

Tutkimuksen lyhyt kuvaus (mm. tutkimuksen tarkoitus, kohderyhmä ja tutkimusmenetelmät) sekä julkaisusuunnitelma (maksimissaan 300 sanaa)

Tutkimus on opinnäytetyö, jonka tarkoituksena on tutkia ALK1- ja BCL2 -translokaatiokehien toiminnallisuutta diagnostiikassa näytteissä. Työssä verrataan kromosomigeenusta in situ hybridisaatiota käytössä olevaan immunohistokemialliseen värijäykseen. ALK1-kutkimien toiminnallista tutkitaan ei-pierisoluissa keuhko- ja karsinoma näytteissä sekä anaplasoissa suunisolukarsinoma näytteissä ja BCL2-kehien toiminnallista follikulaarisen lymfooman näytteissä.

Translokaatiokehien eivät ole aiemmin olleet diagnostiikassa käytössä KYS:n klinisen patologian osastolla. Tavoitteena on suontaa menetelmän alustavaa sisärajaa, jotta saatuja tuloksia voidaan hyödyntää hoito- ja tutkimusvaiheissa.

Tutkimuksen johtaja saa tutkimustulokset keuhko- ja karsinoma näytteistä 2013 aikana. Valmis opinnäytetyö julkaistaan Thesys-julkaisuarkistossa vuoden 2013 loppuun mennessä.

Tutkimus on

☒ amk-tutkinto

☐ ylempi amk-tutkinto

☐ pro gradu

☐ lisensiaattityö

☐ väitöskirja

☐ muu, mikä

Monikeskustutkimus

☐ ei

☐ kyllä

☐ kansallinen

☐ kansainvälinen

Tutkimuksen kokonaisaikataulu

1.1.2013 - lokakuu/marttukuun 2013

Aikataulu KYSissä

Kustannukset

☐ Arvio KYSille koituvista kustannuksista

\_\_\_\_\_ €

Tarkempi kustannuserittely esitettävä erillisellä liitteellä.

☐ Ei aiheuta kustannuksia KYSille



<b>Tutkimuseettisen toimikunnan lausunto</b>	
<input type="checkbox"/> annettu <input type="checkbox"/> käsitteilyssä <input type="checkbox"/> ei ole haettu	
Toimikunta _____	Lausunto nro _____ pvm _____
<b>Johtajaylilääkärin lupa rekisteritutkimuksia varten</b>	
<input type="checkbox"/> annettu <input type="checkbox"/> käsitteilyssä <input type="checkbox"/> ei ole haettu	
<b>STM:n lupa rekisteritutkimuksia varten</b>	
<input type="checkbox"/> annettu <input type="checkbox"/> käsitteilyssä <input type="checkbox"/> ei ole haettu	
<b>Henkilöstöpäällikön lupa henkilökuntaa koskevia tutkimuksia varten</b>	
<input type="checkbox"/> annettu <input type="checkbox"/> käsitteilyssä <input type="checkbox"/> ei ole haettu	
<b>Muu lupa (mikä)</b>	
<input type="checkbox"/> annettu <input type="checkbox"/> käsitteilyssä	
<b>Opinnäytetyön tuotoksen käyttöoikeus luovutetaan KYSille</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> kyllä <input type="checkbox"/> ei	
<b>ALLEKIRJOITUS JA SITOUMUS</b>	
Allekirjoittaneet tutkijat sitoutuvat noudattamaan tulosyksikön esimiesten antamia ohjeita, sairaalan yleisiä sääntöjä sekä salassapito- ja vaitiolovelvollisuutta ja lähettämään tutkimusraportin yksikköön jossa tutkimus on tehty sekä luvan myöntäjälle.	
_____ / _____ 20__	
Tutkijan allekirjoitus	Tutkijan allekirjoitus
Nimen selvennys	Nimen selvennys
<i>Evamaria Kekko</i>	<i>Ilkka</i>
Tutkijan allekirjoitus	Tutkijan allekirjoitus
<i>Evamaria Kekko</i>	<i>Ilkka Junturi</i>
Nimen selvennys	Nimen selvennys
<b>OPINNÄYTETYÖN OHJAAJAT</b>	
<i>Anita Naukkarinen</i>	<i>Sanna Kirjavainen</i>
Ohjaajan allekirjoitus	Ohjaajan allekirjoitus
<i>ANITA NAUKKARINEN</i>	<i>Sanna Kirjavainen</i>
Nimen selvennys	Nimen selvennys
Osoite, puhelin, s-posti	Osoite, puhelin, s-posti
<b>PUOLTO</b> Postitustutkimuksissa puolto tarvitaan joko tulosyksikön ylilääkäriltä (yksi tulosyksikkö), tulosaluejohtajalta (useita tulosyksiköitä) tai johtajaylilääkäriltä (useita tulosalueita).	
<input type="checkbox"/> Puollan hakemusta <input type="checkbox"/> En puolla, perustelut	
_____ / _____ 20__	
Allekirjoitus	
Nimen selvennys, virka-asema	

## PÄÄTÖS

- ☒ Myönnän tutkimusluvan
- ☐ Myönnän tutkimusluvan, mutta ennen tutkimuksen aloittamista tutkimukselle tulee hakea tutkimuseettisen toimikunnan lausunto / johtajayliääkärin lupa rekisteritutkimuksia varten / STM:n lupa rekisteritutkimuksia varten / KYS:n henkilöstöpäällikön lupa henkilökuntaa koskevia tutkimuksia varten / muu lupa, mikä

- ☐ Tulostyösköön / -alueen yllähoitajan / hallintoyllähoitajan päätös nro 5/2013

4.3.2013

Uusikallio KML

Allekirjoitus

Annemari Kivimäki

Nimen selvitys

YHTEYSHENKILÖ KYSISSÄ (Tulostyösköön / -alueen yllähoitaja tai hallintoyllähoitaja nimeää)

Sanna Kirjavainen

Patologian yksikkö C4500

Nimi

Työyksikkö

sanna.kirjavainen@kuh.fi

044-7176088

S-posti

Puhelin

## LIITTEET

☐ Tutkimussuunnitelma

17

sivua

☐ Rahoitussuunnitelma

sivua

☒ Muita liitteitä

7

sivua